



**MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRICULTURA E BIODIVERSIDADE**

**DIVERSIDADE GENÉTICA E RESPOSTAS *IN VITRO* AOS
ESTRESSES HÍDRICO E SALINO EM *Saccharum* spp.**

LEILA ALBUQUERQUE RESENDE DE OLIVEIRA

2019



**MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRICULTURA E BIODIVERSIDADE**

LEILA ALBUQUERQUE RESENDE DE OLIVEIRA

**DIVERSIDADE GENÉTICA E RESPOSTAS *IN VITRO* AOS ESTRESSES HÍDRICO
E SALINO EM *Saccharum* spp.**

Tese apresentada à Universidade Federal de Sergipe, como parte das exigências do Curso de Doutorado em Agricultura e Biodiversidade, área de concentração em Agricultura e Biodiversidade, para obtenção do título de “Doutora em Ciências”.

Orientadora
Prof^a. Dr^a Ana da Silva Lédo

SÃO CRISTÓVÃO
SERGIPE – BRASIL
2019

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA BIBLIOTECA CENTRAL
UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE**

O48d Oliveira, Leila Albuquerque Resende de
Diversidade genética e respostas *in vitro* aos estresses hídrico e salino em *Saccharum* spp. / Leila Albuquerque Resende de Oliveira; orientadora Ana da Silva Léo. – São Cristóvão, 2019.
73 f. ; il.

Tese (doutorado em Agricultura e Biodiversidade) – Universidade Federal de Sergipe, 2019.

1. Cana-de-açúcar. 2. Clorofila. 3. Histologia. 4. Prolina. 5. Enzimas. 6. Marcadores biológicos. I. Léo, Ana da Silva, orient. II. Diversidade genética e respostas *in vitro* aos estresses hídrico e salino *in vitro* em *Saccharum* spp.

CDU: 633.61

LEILA ALBUQUERQUE RESENDE DE OLIVEIRA

**DIVERSIDADE GENÉTICA E RESPOSTAS *IN VITRO* AOS ESTRESSES HÍDRICO
E SALINO EM *Saccharum* spp.**

Tese apresentada à Universidade Federal de Sergipe, como parte das exigências do Curso de Doutorado em Agricultura e Biodiversidade, área de concentração em Agricultura e Biodiversidade, para obtenção do título de “Doutora em Ciências”.

APROVADA em 25 de janeiro de 2019.

Prof^a. Dr^a. Ana Veruska Cruz da Silva
UFS/Embrapa

Prof^a. Dr^a. Maria de Fátima Arrigoni-Blank
UFS

Dr. Leandro Eugenio Cardamone Diniz
UFLA/Embrapa

Dr^a. Priscilla Santana Santos
ADEMA/SE

Prof^a. Dr^a. Ana da Silva Léo
Embrapa Tabuleiros Costeiros/UFS
(Orientadora)

SÃO CRISTÓVÃO
SERGIPE – BRASIL

Aos meus pais,
Dedico

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por me dar saúde, sabedoria e paciência.

À Universidade Federal de Sergipe, mais especificamente ao Programa de Pós Graduação em Agricultura e Biodiversidade (PPGAGRI), e à Embrapa Tabuleiros Costeiros, pela oportunidade de realização da minha tese.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa de estudo concedida.

Aos meus pais, José Carlos e Zuleide; meus irmãos, Antônio Carlos, Livia e Lili; meu sobrinho Mateus; meus cunhados Ulisses e Samara; e ao meu namorado Diogo, por todo o apoio ao longo da minha trajetória.

À minha orientadora, Ana Lédo, por todas as oportunidades oferecidas desde que ingressei no Doutorado e principalmente pelos ensinamentos, orientação, confiança e motivação.

À Ana Veruska pelo apoio e carinho de sempre.

Aos técnicos Inácio e Silvio, e ao analista Bruno, pela atenção, paciência e ensinamentos no laboratório durante a execução dos experimentos.

À minha família LABCULT, Milena, Carol, Annie, Fernanda, Bella, Josi e Lucas, por toda a ajuda, e principalmente pela amizade.

Vocês todos foram fundamentais nessa etapa.

SUMÁRIO

	Página
LISTA DE FIGURAS	i
LISTA DE TABELAS	iii
LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS	iv
RESUMO	v
ABSTRACT	vi
1. INTRODUÇÃO GERAL	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	2
2.1. A cultura da cana-de-açúcar	2
2.1.1. Origem e importância econômica da cultura	2
2.1.2. Taxonomia e origem genética do gênero <i>Saccharum</i>	3
2.1.2.1. <i>Saccharum spontaneum</i> L.	3
2.1.2.2. <i>Saccharum robustum</i> Brandes. e Jeswiet. ex Grassl.	4
2.1.2.3. <i>Saccharum officinarum</i> L.	4
2.1.2.4. <i>Saccharum sinense</i> Roxb. e <i>Saccharum barberi</i> Jeswiet.	5
2.1.2.5. <i>Saccharum edule</i> Hassk.	5
2.2. Diversidade genética de <i>Saccharum</i>	5
2.3. Estresses abióticos em plantas	7
2.3.1. Estresse hídrico em cana-de-açúcar	7
2.3.2. Estresse salino em cana-de-açúcar	9
2.4. Cultura de tecidos de plantas	11
3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	13
4. ARTIGO 1: DIVERSIDADE GENÉTICA DO COMPLEXO <i>Saccharum</i> USANDO MARCADORES ISSR	21
Resumo	21
Abstract	22
4.1. Introdução	22
4.2. Material e Métodos	23
4.3. Resultados e Discussão	25
4.4. Conclusões	31
4.5. Referências Bibliográficas	31
5. ARTIGO 2: EFEITOS DO ESTRESSE HÍDRICO <i>IN VITRO</i> NO CRESCIMENTO, ACÚMULO DE PROLINA E DEFESA ANTIOXIDANTE EM CANA-DE-AÇÚCAR	34
Resumo	34
Abstract	35
5.1. Introdução	35
5.2. Material e Métodos	36
5.2.1. Material vegetal	36
5.2.2. Condições de crescimento e tratamento de estresse	36
5.2.3. Avaliações de crescimento e biomassa	36
5.2.4. Análise de prolina	36
5.2.5. Análise de enzimas antioxidantes	37
5.2.5.1. Extração	37
5.2.5.2. Superóxido Dismutase (SOD)	37
5.2.5.3. Catalase (CAT)	37
5.2.5.4. Ascorbato Peroxidase (APX)	37
5.2.6. Desenhos Experimentais e Análise Estatística	38
5.3. Resultados	38

5.3.1. Avaliação do crescimento	38
5.3.2. Biomassa	41
5.3.3. Prolina	42
5.3.4. Enzimas antioxidantes.....	43
5.4. Discussão.....	45
5.4.1. Avaliação do crescimento	45
5.4.2. Biomassa	45
5.4.3. Prolina	46
5.4.4. Enzimas antioxidantes.....	46
5.5. Conclusões	47
5.6. Referências	47
6. ARTIGO 3: ALTERAÇÕES BIOQUÍMICAS, FISIOLÓGICAS E DE CRESCIMENTO EM RESPOSTA À SALINIDADE <i>IN VITRO</i> EM CANA-DE- AÇÚCAR	52
Resumo	52
Abstract.....	53
6.1. Introdução	53
6.2. Material e Métodos	54
6.2.1. Material vegetal	54
6.2.2. Condições de crescimento e tratamento de estresse	54
6.2.3. Caracteres biométricos, fisiológicos e bioquímicos	55
6.2.3.1. Avaliação de crescimento	55
6.2.3.2. Determinação do teor de prolina.....	55
6.2.3.3. Estimativa do conteúdo de clorofila	55
6.2.3.4. Análises histológicas.....	55
6.2.4. Delineamentos experimentais e análises estatísticas	55
6.3. Resultados e Discussão	56
6.3.1. Efeito da salinidade em parâmetros biométricos	56
6.3.2. Efeito da salinidade no teor de prolina	60
6.3.3. Efeito da salinidade no conteúdo de clorofila total.....	62
6.3.4. Efeito da salinidade na anatomia foliar.....	64
6.4. Conclusões	64
6.5. Referências Bibliográficas	64
7. CONSIDERAÇÕES FINAIS	69
ANEXOS	70

LISTA DE FIGURAS

ARTIGO 1

Figura		Página
1	Coeficiente de correlação e número de fragmentos, usando marcadores ISSR, entre 26 indivíduos de cana-de-açúcar provenientes da Embrapa Tabuleiros Costeiros, baseados na similaridade genética obtida pelo método bootstrap.	25
2	Perfis eletroforéticos ISSR de 26 acessos de cana-de-açúcar amplificados em gel de agarose usando o primer UBC 887. Embrapa Tabuleiros Costeiros, Brasil. M: marcador 100 pb; CN: controle negativo; 1 a 26: amostras de DNA	26
3	Representação filogenética do Método do Grupo de Pares Não Ponderados utilizando o agrupamento de médias aritméticas (UPGMA) estimado pela similaridade genética do coeficiente de Jaccard e pela análise de bootstrap (10 000x) para 26 acessos de cana-de-açúcar do Banco Ativo de Germoplasma da Embrapa Tabuleiros Costeiros, Brasil.	30
4	Análise de coordenadas principais (PCoA) de 26 acessos de cana-de-açúcar do Banco Ativo de Germoplasma da Embrapa Tabuleiros Costeiros, Brasil.	31

ARTIGO 2

Figura		Página
1	Efeito do estresse hídrico na porcentagem de sobrevivência de acessos de cana-de-açúcar aos 30 dias de cultivo <i>in vitro</i>	38
2	Brotações de cana-de-açúcar aos 30 dias de cultivo <i>in vitro</i> em diferentes potenciais hídricos. A – <i>S. robustum</i> (Q45923), B – <i>S. robustum</i> (GH49), C – <i>S. robustum</i> (MIA35301), D – <i>S. spontaneum</i> (NSL291970), E – <i>S. officinarum</i> – PI88652) . 1 – 0 MPa; 2 – -0,3 MPa; 3 – -0,6 MPa; 4 – -0,9 MPa; 5 – -1,2 MPa.....	41

ARTIGO 3

Figura		Página
1	Efeito da salinidade <i>in vitro</i> no comprimento de brotações (A), comprimento de raízes (B), número de raízes (C), número de brotações (D), massa fresca de brotações (E) e massa seca de raízes (F) de acessos de cana-de-açúcar aos 60 dias de cultivo <i>in vitro</i> em diferentes concentrações salinas (0; 50; 100; 150; 200 mM NaCl). ● <i>S. robustum</i> (Q45251); ▲ <i>Saccharum</i> spp.(Q45416); ■ <i>S. officinarum</i> (Q44830).	57
2	Brotações de cana-de-açúcar aos 40 dias de cultivo <i>in vitro</i> em diferentes concentrações salinas induzidas por NaCl. A - <i>S. robustum</i> (Q45251), B - <i>Saccharum</i> spp. (Q45416), C - <i>S. officinarum</i> (Q44830).....	59
3	Efeito da salinidade no conteúdo de Prolina em A - <i>S. robustum</i> (Q45251), B - <i>Saccharum</i> spp.(Q45416), C - <i>S. officinarum</i> (Q44830) aos 20, 40 e 60 dias de cultivo <i>in vitro</i> em diferentes concentrações salinas (0; 50; 100; 150; 200 mM de NaCl).	60
4	Efeito da salinidade no conteúdo de clorofila total em A - <i>S. robustum</i> (Q45251), B - <i>Saccharum</i> spp.(Q45416), C - <i>S. officinarum</i> (Q44830) aos 20, 40 e 60 dias de cultivo <i>in vitro</i> em diferentes concentrações salinas (0; 50; 100; 150; 200 mM de NaCl)	62

- 5 Seções transversais de folhas de cana-de-açúcar submetidas à 200 mM de NaCl aos 60 dias de cultivo *in vitro*. **A** - *S. robustum* (Q45251), **B** - *Saccharum* spp. (Q45416), **C** - *S. officinarum* (Q44830). Estruturas: **b** – células buliformes, **bs** – células da bainha do feixe vascular, **c** – cutícula, **cc** – células incolores, **e** – epiderme da face adaxial, **ea** – epiderme da face abaxial, **m** – mesófilo, **p** – floema, **s** – estômato, **vb** – feixes vasculares, **x** – xilema. Barras apresentam tamanho de 50 µm.....

LISTA DE TABELAS

ARTIGO 1

Tabela		Página
1	Características dos 26 acessos do “Complexo <i>Saccharum</i> ” do Banco Ativo de Germoplasma da Embrapa Tabuleiros Costeiros, Brasil.	24
2	Iniciadores de repetição de sequência simples (ISSR) usados em 26 acessos de cana-de-açúcar do Banco Ativo de Germoplasma da Embrapa Tabuleiros Costeiros, Brasil, com suas respectivas sequências, temperatura de anelamento (AT), número de bandas fragmentadas (NFB), porcentagem de polimorfismo (P%), índice de Shannon (I) e heterozigosidade esperada (He)	26
3	Matriz gerada baseada no coeficiente de similaridade de Jaccard em 26 acessos de cana-de-açúcar do Banco Ativo de Germoplasma da Embrapa Tabuleiros Costeiros, Brasil.....	29

ARTIGO 2

Tabela		Página
1	Sobrevivência (%) de acessos de cana-de-açúcar, aos 30 dias de cultivo <i>in vitro</i> sob estresse hídrico.....	38
2	Número de brotações, comprimento de brotações, número de raízes e comprimento de raízes em acessos de cana-de-açúcar, aos 30 dias de cultivo <i>in vitro</i> sob estresse hídrico	40
3	Biomassa (massa fresca e seca) de acessos de cana-de-açúcar, aos 30 dias de cultivo <i>in vitro</i> sob estresse hídrico	42
4	Teor de prolina livre ($\mu\text{mol/g}$ Mf) nos acessos de cana-de-açúcar, aos 30 dias de cultivo <i>in vitro</i> sob estresse hídrico.....	43
5	Atividade de enzimas antioxidantes em acessos de cana-de-açúcar, aos 30 dias de cultivo <i>in vitro</i> sob estresse hídrico.....	44

ARTIGO 3

Tabela		Página
1	Comprimento da parte aérea, comprimento da raiz, número de raízes e número de brotações (média \pm erro padrão da média) de acessos de cana-de-açúcar aos 60 dias de cultivo <i>in vitro</i> em diferentes concentrações salinas	58
2	Biomassa de acessos de cana-de-açúcar (média \pm erro padrão da média) aos 60 dias de cultivo <i>in vitro</i> submetidos ao estresse salino <i>in vitro</i> . Mf – massa fresca; Ms – massa seca	59
3	Teor de prolina livre ($\mu\text{mol.g}^{-1}$ de Mf) em acessos de cana-de-açúcar (média \pm erro padrão da média), aos 20, 40 e 60 dias de cultivo <i>in vitro</i> sob estresse salino	61
4	Conteúdo de clorofila total (mg.g^{-1} de Mf) em acessos de cana-de-açúcar (média \pm erro padrão da média), aos 20, 40 e 60 dias de cultivo <i>in vitro</i> sob estresse salino	63

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

AIE	Agência Internacional de Energia
UNICA	União de Indústria de Cana-de-açúcar
ANEEL	Agência Nacional de Energia Elétrica
IAA	Instituto do açúcar e do Alcool
PLANALSUCAR	Programa Nacional de Melhoramento da Cana-de-açúcar
PROALCOOL	Programa Nacional do Alcool
CONAB	Companhia Nacional de Abastecimento
CO ₂	Dióxido de Carbono
ECe	Condutividade Elétrica do Etrato de Saturação
NaCl	Cloreto de Sódio
FAO	<i>Food and Agriculture Organization of the United Nations</i>
EMBRAPA	Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
AFLP	<i>Amplified Fragment Length Polymorphism</i>
RAPD	<i>Random Amplified Polymorphic DNA</i>
ISSR	<i>Inter Simple Sequence Repeats</i>
SSR	<i>Simple Sequence Repeat</i>
NaCl ₂	Cloreto de Magnésio
BAG	Banco Ativo de Germoplasma
PCR	Reação em Cadeia Polimerase
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
UPGMA	Método de Grupo de Pares Não Ponderados com Média Aritmética
I	Índice de Shannon
He	Heterozigosidade esperada
E	Valor de estresse
r	Estimativa de correlação
AT	Temperatura de anelamento
NFB	Número de bandas fragmentadas
%P	Porcentagem de polimorfismo
MPa	Megapascal
SOD	Superóxido dismutase
CAT	Catalase
APX	Ascorbato peroxidase
EROS	Espécies reativas de oxigênio
BAP	6-benzilaminopurina
MS	Meio de cultura Murashige e Skoog
Mf	Massa fresca
Ms	Massa seca
PVP	Polivinilpirrolidona
NBT	Nitroazul de tetrazólio
H ₂ O ₂	Peróxido de Hidrogênio
MM	Meio de multiplicação
H ₃ PO ₄	Ácido fosfórico

RESUMO

OLIVEIRA, Leila Albuquerque Resende de. **Diversidade genética e respostas *in vitro* aos estresses hídrico e salino em *Saccharum* spp.** São Cristóvão: UFS, 2019. 73p. (Tese – Doutorado em Agricultura e Biodiversidade)*

A recente busca por combustíveis renováveis que substituam o petróleo e não sejam tão agressivos ao meio ambiente faz da cana-de-açúcar um produto de importância global por possibilitar um desenvolvimento mais sustentável. O Brasil é o maior produtor mundial da cultura. Com a expansão do plantio da cana-de-açúcar em áreas com condições climáticas variáveis, principalmente regiões secas e salinas, torna-se essencial a utilização de tecnologias que permitam identificar rapidamente genótipos com diferentes graus de tolerância aos diferentes estresses abióticos, visando sua utilização em programas de melhoramento. Além disso, a utilização efetiva de recursos genéticos armazenados em bancos de germoplasma, tanto para ampliação da base genética como para introdução de características de interesse, é dependente da sua caracterização e avaliação molecular. Assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar a diversidade genética de acessos de *Saccharum* do Banco Ativo de Germoplasma da Embrapa Tabuleiros Costeiros, e caracterizá-los *in vitro* quanto à tolerância aos estresses salino e hídrico, para uso em hibridações em programas de melhoramento genético e intercâmbio de germoplasma. Os experimentos foram realizados nos Laboratórios de Biologia Molecular, e de Cultura de Tecidos de Plantas da Embrapa Tabuleiros Costeiros. Para a avaliação molecular de 26 acessos, 16 primers foram utilizados, resultando em 87 fragmentos com 91,13% de polimorfismo. A similaridade dos indivíduos variou entre 0,22 e 0,87. Os indivíduos mais próximos geneticamente foram RB867515 e RB92579, e os mais distantes foram PI240785 e NSL 291970. Por meio da UPGMA houve a formação de quatro grupos distintos, o que demonstrou haver uma diversidade alta no BAG *Saccharum*. Para o estresse hídrico *in vitro*, foram utilizadas brotações adventícias de cinco acessos das espécies *Saccharum robustum*, *Saccharum spontaneum* e *Saccharum officinarum*, cultivadas em meio Murashige e Skoog em cinco potenciais hídricos, 0, -0.3, -0.6, -0.9, -1.2 MPa, induzidos por manitol. Sobrevivência, comprimento das brotações e raízes, número de brotações e raízes, biomassa, teor de prolina nas folhas e atividade de enzimas antioxidantes foram analisados. Houve diferença entre as espécies, e ainda, dentro da mesma espécie de cana-de-açúcar quando submetidas ao estresse hídrico *in vitro*, sendo que *S. officinarum* demonstrou ser mais tolerante. A prolina pode ser utilizada como um indicador bioquímico de resposta ao estresse hídrico em acessos de cana-de-açúcar e seu acúmulo foi intensificado nos acessos de *S. robustum* e *S. spontaneum*. A atividade da catalase permaneceu inalterada com o aumento do estresse nos acessos avaliados. Já para o estresse salino *in vitro*, foram utilizadas brotações de acessos das espécies *Saccharum robustum*, *Saccharum* spp., *S. officinarum*, cultivadas em meio Murashige e Skoog, em cinco concentrações 0, 50, 100, 150, 200 mM de NaCl. Comprimento e número de brotações e de raízes, massa fresca, massa seca, teor de prolina nas folhas, conteúdo de clorofila total e alterações morfológicas dos tecidos foliares foram analisados. O crescimento *in vitro* dos acessos *Saccharum robustum*, *Saccharum* spp. e *Saccharum officinarum* é afetado pela salinidade induzida por NaCl. O acúmulo de prolina e decréscimo de clorofila é intensificado em *Saccharum* spp., além de mudança na anatomia de células, caracterizando-se como mais sensível ao sal.

Palavras-chave: ajuste osmótico, clorofila, enzimas antioxidantes, histologia, marcadores moleculares ISSR, prolina.

* Comitê Orientador: Ana da Silva Léo – Embrapa/UFS (Orientador)

ABSTRACT

OLIVEIRA, Leila Albuquerque Resende de Oliveira. **Genetic diversity and *in vitro* responses to drought and saline stresses in *Saccharum* spp.** São Cristóvão: UFS, 2019. 73p. (Thesis - Doctor of Science in Agriculture and Biodiversity).*

In the context of the recent search for renewable fuels that replace oil and are environmentally less harmful, sugarcane comes into focus as a product of global importance for enabling a more sustainable development. Brazil is the world's largest producer of the crop. Due the expansion of sugarcane cultivation into areas with variable climatic conditions, mainly into dry and saline regions, the use of technologies that allow the rapid identification of genotypes, with different tolerance degrees to several abiotic stresses, for exploitation in breeding programs, becomes imperative. In addition, an effective use of the genetic resources stored in germplasm banks, both to increase the genetic base and introgress traits of interest, requires prior characterization and molecular evaluation. Thus, the objective of this study was to assess the genetic diversity of *Saccharum* accessions in the genebank of Embrapa Coastal Tablelands (BAG *Saccharum*), and to characterize them *in vitro* for tolerance to salt and water stress, with a view to hybridizations and germplasm exchange in breeding programs. The experiments were carried out at the Laboratories of Molecular Biology and of Plant Tissue Culture, of Embrapa Coastal Tablelands. For the molecular evaluation of 26 accessions, 16 primers were used, resulting in 87 fragments with 91.13% polymorphism. The similarity of plants ranged from 0.22 to 0.87. The genetically closest plants were RB867515 and RB92579, and the most distant were PI240785 and NSL 291970. By the unweighted pair-group method based on arithmetic averages (UPGMA), four distinct groups were formed, indicating a high diversity in the BAG *Saccharum*. To evaluate water stress *in vitro*, adventitious shoots of five *Saccharum robustum*, *S. spontaneum* and *S. officinarum* cultivars, were cultivated in Murashige -Skoog medium, at five hydric potentials (0, -0.3, -0.6, -0.9, -1.2 MPa), induced by mannitol. Survival, shoot and root length, number of shoots and roots, bioweight, proline content in leaves and activity of antioxidant enzymes were analyzed. Differences among the sugarcane species as well as within the same species were observed under different water stress levels *in vitro*. *Saccharum officinarum* was found to be the most tolerant. Proline can be used as a biochemical indicator of response to water stress in sugarcane accessions and its accumulation was intensified in *S. robustum* and *S. spontaneum* accessions. Catalase activity remained unchanged under increased stress in the accessions evaluated. *Saccharum robustum*, *Saccharum* spp., *S. officinarum*, cultivated in Murashige -Skoog medium, were used at five concentrations (0, 50, 100, 150, 200 mM NaCl). Shoot and root length and number, fresh weight, dry weight, proline leaf content, total chlorophyll content and morphological alterations of the leaf tissues were analyzed. The *in vitro* growth of *S. robustum*, *Saccharum* spp. and *S. officinarum* accessions was affected by NaCl-induced salinity. Proline accumulation and chlorophyll decrease are intensified in *Saccharum* spp., aside from changes in the cell anatomy, characterizing the species as more salt-sensitive than the others.

Key-words: osmotic adjustment, chlorophyll, antioxidant enzymes, histology, molecular markers ISSR, proline.

* Supervising Committee: Ana da Silva Léo – Embrapa/UFS (Advisor)

1. INTRODUÇÃO GERAL

Estudos apontam o esgotamento das fontes de energia fóssil para as próximas cinco décadas, destacando a necessidade de buscar outras fontes alternativas de energia. De acordo com a previsão da Agência Internacional de Energia (AIE), até o ano de 2030, os biocombustíveis representarão cerca de 7% do combustível utilizado no transporte, sendo a União Europeia, os Estados Unidos e o Brasil os principais produtores e consumidores. Todos esses fatores, cuja importância varia de país para país, vêm criando oportunidades para a viabilização econômica de novas fontes de energia de biomassa (EMBRAPA¹, 2018).

O uso crescente de biomassa para a produção de energia de biocombustíveis é uma estratégia importante para uma nova matriz energética mundial, sobretudo em áreas tropicais. A biomassa é um recurso natural renovável que resulta do uso de resíduos agrícolas, florestais, pecuários, fezes de animais ou lixo e é considerada positiva no meio ambiente porque pode ser: reduzida, reciclada, reutilizada e aproveitada para produzir energia (COSTA; DUARTE, 2010).

O Brasil vem se destacando no cenário internacional quanto à produção de energia renovável e é modelo em geração sustentável de energia e considerado protagonista na substituição dos combustíveis fósseis. Segundo dados do Boletim de abril de 2018 da UNICA (União de Indústria de Cana-de-Açúcar), a fonte biomassa em geral representa 9% da potência outorgada pela Agência Nacional de Energia Elétrica (ANEEL) na matriz elétrica do Brasil. Quando se estratifica a fonte fóssil, a bioeletricidade assume a segunda posição na matriz elétrica brasileira. Dentre as biomassas mais utilizadas e com maior potencial para produção de energia, a cana-de-açúcar destaca-se no cenário nacional por apresentar uma área plantada de 8,73 milhões de hectares e uma produção de 633,26 milhões de toneladas (CONAB, 2018). Com referência somente à bioeletricidade da cana, o setor sucroenergético detém hoje em torno de 7% da potência outorgada no Brasil e 77% da fonte biomassa, sendo a quarta fonte de geração mais importante da matriz elétrica em termos de capacidade instalada, atrás da fonte hídrica e das termelétricas com gás natural e das eólicas.

O atendimento à demanda por biomassa para produção de bioenergia deverá estar aliado à proteção dos ecossistemas e a garantia da segurança alimentar. Desta forma, a produção de biomassa para produção de energia deverá se expandir preferencialmente para áreas degradadas ou de baixa aptidão agrícola, onde as condições climáticas são altamente variáveis, a disponibilidade hídrica é limitada (AZEVEDO; LEA, 2011; CARR; KNOX, 2011) e a salinização solos é encontrada (VASCONCELOS et al., 2013), o que irá requerer o desenvolvimento de genótipos adaptados aos ambientes de produção marginais, tanto em termos climáticos quanto edáficos.

Segundo dados do Atlas de Energia Elétrica do Brasil, a cana-de-açúcar é um recurso com grande potencial, dentre as fontes de biomassa, para geração de eletricidade existente no país, por meio da utilização do bagaço e da palha. A participação é importante não só para a diversificação da matriz elétrica, mas também porque a safra coincide com o período de estiagem na região Sudeste/Centro-Oeste, onde está concentrada a maior potência instalada em hidrelétricas do país. Vários fatores contribuem para o cenário de expansão. Um deles é o volume já produzido e o potencial de aumento da produção da cana-de-açúcar, estimulada pelo consumo crescente de etanol.

A cultura da cana-de-açúcar é bastante dependente das condições edafoclimáticas (EMBRAPA², 2018). Quando em condições de estresse hídrico, há redução do crescimento radicular e, conseqüentemente, a produtividade pode ser reduzida. Portanto, a disponibilidade de água nos ambientes produtivos é um dos fatores essenciais no crescimento e desenvolvimento da cultura (VIOLANTE, 2012).

Já a resposta das plantas às condições de salinidade está relacionada com um grau de tolerância ao sal, que depende da concentração e da natureza dos sais dissolvidos, de fatores climáticos, da absorção de água e nutrição vegetal (HOLANDA et al., 2007). A cana-de-açúcar apresenta alta sensibilidade à salinidade em vários estágios de crescimento, afetando as

atividades metabólicas gerais e causando morte da planta (ZHU, 2001). Variedades de cana diferem em suas respostas à salinidade do solo, assim, torna-se cada vez mais importante a utilização de tecnologias que permitam identificar rapidamente genótipos com diferentes graus de tolerância ao estresse, visando sua utilização em programas de melhoramento.

Uma proposta para acelerar o processo de seleção de genótipos tolerantes é a utilização da cultura de tecidos vegetais. Essa tecnologia apresenta diversas técnicas que, além de permitirem a comparação de grande número de plantas, são também rápidas e de custo relativamente baixo (GEORGE et al., 2008), possibilitando a identificação e seleção de genótipos tolerantes antes da verificação de sua tolerância no campo.

Estudos com cana-de-açúcar (*Saccharum* spp.) têm sido dirigidos à elucidação de mecanismos de adaptação de alguns genótipos ao estresse salino e hídrico, induzidos *in vitro*, a fim de determinar a tolerância das plantas em tais condições. No entanto, novos acessos devem ser priorizados em programas de melhoramento, para atender as demandas do setor energético.

Assim, a utilização efetiva de recursos genéticos armazenados em bancos de germoplasma, tanto para ampliação da base genética como para introdução de características de interesse, é dependente da sua caracterização e avaliação molecular na discriminação da variabilidade genética dos acessos.

A Embrapa em parceria com o *National Center for Genetic Resources and Preservation* (NCGRP/ARS/USDA) vem intensificando as ações de introdução de acessos para a formação de coleções de trabalho e de bancos de germoplasma, a fim de estimular a pesquisa sobre adaptabilidade e tolerância desses acessos às condições locais para futuros programas de melhoramento genético. Sendo assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar a diversidade genética de acessos de cana-de-açúcar do Banco Ativo de Germoplasma da Embrapa Tabuleiros Costeiros, e caracterizar acessos do complexo *Saccharum* spp. quanto à tolerância aos estresses salino, hídrico durante cultivo *in vitro*, visando o uso na seleção de acessos para a realização de hibridações no melhoramento genético da espécie e intercâmbio de germoplasma.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. A cultura da cana-de-açúcar

2.1.1. Origem e importância econômica da cultura

A cana-de-açúcar pertence à família *Poaceae* e ao gênero *Saccharum*, que abrange várias espécies. O centro de origem dessas espécies são as ilhas do Arquipélago da Polinésia, a Nova Guiné e a Índia. No Brasil, as primeiras mudas de cana foram introduzidas em 1532, trazidas da ilha da Madeira. A cana-de-açúcar, encontrando características climáticas favoráveis e solos férteis, expandiu-se rapidamente pelo nordeste do país (Bahia, Piauí, Alagoas, Paraíba) de tal maneira que 17 anos depois existiam 23 engenhos em Pernambuco, sustentando as capitanias hereditárias. Na década de 1580, o Brasil já havia conquistado o monopólio mundial de produção de açúcar e assegurado a Portugal a elevada lucratividade com esse mercado (CARVALHO; FURTADO, 2013).

Desde os tempos de Brasil Colônia a cultura vem se destacando no setor agrícola. A cadeia produtiva passou por vários períodos de transformação, e com a consolidação dos mercados internos e externos a produção canavieira aos poucos foi se concentrando no estado de São Paulo. Em meados da década de 1960, constantes alterações na cotação do açúcar no mercado internacional e a atrofia da modernização industrial relegaram a indústria canavieira no Brasil a segundo plano, incentivando mudanças na direção do setor (TSUKADA, 2011).

A criação de um programa de melhoramento da cana-de-açúcar financiado pela agroindústria canavieira do Brasil, a COPERSUCAR, foi uma das iniciativas com o objetivo de gerar inovações significativas para as áreas agrícolas e para todo o sistema de produção. Simultaneamente, na área federal, o Instituto do Açúcar e do Alcool (IAA), criado em 1933,

estabeleceu o Programa Nacional de Melhoramento da Cana-de-açúcar (PLANALSUCAR) iniciado em 1966, com o objetivo de elevar os rendimentos da cultura canavieira. Na década de 70, o setor produtor de cana ganhou novo impulso científico com o Programa Nacional do Alcool (PROALCOOL), que estimulou também o desenvolvimento de tecnologias para a produção de álcool combustível, em decorrência da crise do petróleo (RAMOS, 1999).

Atualmente o Brasil é o maior produtor mundial de cana-de-açúcar. Esta é uma das principais culturas do mundo, cultivada em mais de 100 países, e representa uma importante fonte de mão de obra no meio rural nesses países. Apesar desta difusão mundial, cerca de 80% da produção do planeta está concentrada em dez países: Brasil, Índia, China, México, Tailândia, Paquistão, Colômbia, Austrália, Indonésia, Estados Unidos (NOVACANA, 2018).

De acordo com os dados do último levantamento da safra de cana-de-açúcar 2017/18 da Companhia Nacional de Abastecimento (Conab), a produção chegou a 633,26 milhões de toneladas, com área colhida de 8,73 milhões de hectares e produtividade média de 72.543 kg/ha (NOVACANA, 2018).

A produção de etanol manteve-se estável, com 27,76 bilhões de litros. Já o açúcar caiu para 37,87 milhões de toneladas, com retração de 2,1% em relação à safra anterior, devido à menor quantidade de cana disponível e o direcionamento para a produção de etanol, visto que os preços no mercado internacional caíram (NOVACANA, 2018).

No Brasil, a cana-de-açúcar é a terceira cultura temporária em termos de ocupação de área, atrás apenas da soja e do milho. Merece destaque o estado de São Paulo, que produz próximo de 60% de toda a cana, açúcar e etanol do país. O segundo maior produtor é o estado do Paraná, com 8% da cana moída no Brasil (UNICA, 2018).

2.1.2. Taxonomia e origem genética do gênero *Saccharum*

A cana-de-açúcar pertence à divisão *Magnoliophyta*, classe *Liliopsida*, ordem *Cyperales*, família *Poaceae*, tribo *Andropogonae*, subtribo *Saccharininae*, gênero *Saccharum* (SILVA, 2012).

Ao gênero *Saccharum* incluem-se seis espécies: *S. spontaneum*, *S. robustum*, *S. officinarum*, *S. sinense*, *S. barberi* e *S. edule*. O “Complexo *Saccharum*” é constituído pelas espécies que compõem o gênero *Saccharum* juntamente com gêneros relacionados filogeneticamente (*Erianthus*; *Sclerostachya*; *Narenga*; e *Miscanthus*). As atuais variedades de cana-de-açúcar são híbridos originados de cruzamentos interespecíficos feitos no início do século XX envolvendo principalmente plantas de *S. officinarum* e *S. spontaneum*. Estes híbridos são citados como *Saccharum* spp. (LANDELL; BRESSIANI, 2008).

2.1.2.1. *Saccharum spontaneum* L.

A espécie *S. spontaneum* apresenta duas subespécies: *indicum* e *aegyptiacum*. É descrita como uma espécie altamente polimórfica, com grande variabilidade entre plantas, e por apresentar alta adaptabilidade, pode ser encontrada em diversos ambientes (desertos, baixadas encharcadas, rochas, regiões litorâneas etc), altitudes (do nível do mar às montanhas do Himalaia) e condições climáticas (de regiões de clima tropical a locais de inverno nevado) (PANGE, 1933; PANGE; SRINIVASAN, 1957).

A espécie possui citótipos (populações com ploidias diferentes) com número cromossômico diploide ($2n$) variando de 40 a 128 com $x=8$, ou seja, todos os indivíduos que compõem a espécie são de origem poliploide, podendo ser classificados de pentaploides (cinco cópias de cada um dos oito cromossomos) até hexadecaploides (dezesesseis cópias de cada um dos oito cromossomos). Plantas de *S. spontaneum* com $2n=40$ são encontradas na região norte da Índia e há hipóteses de sua origem ter ocorrido a partir da hibridação natural de plantas de *Sclerostachya* e *Erianthus* seção *Ripidium* (RAO; BABU, 1955).

Pela grande variabilidade, *S. spontaneum* é a espécie que mais contribuiu com características de interesse agrônomo, além de ser uma das principais fontes de fibra aos programas de melhoramento genético que visam o desenvolvimento de variedades com grande

potencial para a produção de biomassa. A alta produtividade e resistência a estresses bióticos e abióticos encontrados nas variedades híbridas são em grande parte atribuíveis a *S. spontaneum* (NAIDU; SREENIVASAN, 1987; ROACH, 1977).

Morfologicamente as plantas podem se desenvolver em pequenas touceiras em forma de tufo com ou sem colmos ou em touceiras de hábito ereto com colmos de até 2,5 m de altura e diâmetro entre 5 a 13 mm. Os colmos são ricos em fibras e são pobres no conteúdo de sacarose. Em geral, são plantas de grande perfilhamento e possuem um rizoma vigoroso que se alastra no solo de modo bastante invasivo (FERREIRA, 2010). Podem distinguir-se de outras espécies de *Saccharum* cultivadas por apresentarem canas mais finas e uma inflorescência estreita (PURSEGLOVE, 1972).

2.1.2.2. *Saccharum robustum* Brandes. e Jeswiet. ex Grassl.

Saccharum robustum é uma espécie silvestre. O centro de origem e diversidade dessa espécie é a região de Nova Guiné. Uma das hipóteses para a sua origem é a de que surgiu a partir de hibridações naturais de *S. spontaneum* ($2n=80$) com outros gêneros (possivelmente *Erianthus* e *Miscanthus*) (DANIELS et al., 1975).

Grupos de híbridos para *S. robustum* já foram reconhecidos, dentre os quais apresentaram número cromossômico $2n=60$, $2n=80$, e $2n=114-200$ (DANIELS; ROACH, 1987).

Morfologicamente as plantas de *S. robustum* são extremamente vigorosas, formando touceiras densas com colmos que podem chegar a 10 m de altura e diâmetro de 20 a 45 mm, ricos em fibras e pouca sacarose. As folhas são frequentemente largas (NAIDU; SREENIVASAN, 1987). São canas selvagens que se adaptam às inúmeras condições ambientais, mas são suscetíveis ao mosaico (SILVA, 2012).

2.1.2.3. *Saccharum officinarum* L.

É conhecida como “cana nobre”, por chamar a atenção pelos seus colmos largos (diâmetro variando de 14 a 46 mm), suculentos, doces (com porcentagem de sacarose entre 7-22%) e diversidade de cores. Diferentemente das espécies *S. spontaneum* e *S. robustum*, a espécie *S. officinarum* não é conhecida no estado selvagem (SREENIVASAN et al., 1987).

Acredita-se que o centro de origem de *S. officinarum* foi na área da Indonésia/Nova Guiné, onde foi cultivado como uma cultura de jardim em 8000 a.C. Seu cultivo se espalhou ao longo das rotas de migração humana para o sudeste da Ásia, Índia e Pacífico, hibridizando com canas silvestres. Chegou ao Mediterrâneo por volta de 500 a.C. com dispersão para o Marrocos, Egito, Síria, Creta, Grécia e Sicília, os principais produtores até o século 15, seguido por introdução à África Ocidental e, posteriormente, América Central e do Sul e as Índias Ocidentais (FAUCONNIER, 1993). No Brasil a espécie foi introduzida durante o período da colonização por Martim Afonso de Souza em 1532, por meio de mudas oriundas da Ilha da Madeira, dando início ao ciclo do açúcar no Brasil (FIGUEIREDO, 2008).

A espécie possui número cromossômico $2n=80$, com $x=10$ (ou seja, todos os indivíduos que compõem a espécie são de origens poliploides, sendo classificados como octaploides, o que significa ter oito cópias de cada um dos dez cromossomos). É a única espécie dentro do gênero *Saccharum* em que o número cromossômico não é variável entre os indivíduos (PRICE, 1963).

No Brasil a variedade Caiana, introduzida em Pernambuco pelos holandeses, destacou-se e foi durante quase 70 anos (1810-1880) a principal variedade introduzida e reconhecida em substituição à Creoula (FIGUEREDO, 2008). Desde as primeiras décadas do século XX essas variedades deixaram de ser cultivadas extensivamente no mundo por susceptibilidade a diversas doenças. Por isso tornou-se a espécie base nos programas de melhoramento genético, juntamente com *S. spontaneum*, para a formação das atuais variedades de cana-de-açúcar. *S. officinarum* contribuiu principalmente como fonte genética para produção de sacarose, além de outras características importantes, tais como colmos suculentos, boa pureza do caldo e teor de fibra adequado para moagem (NAIDU; SREENIVASAN, 1987).

2.1.2.4. *Saccharum sinense* Roxb. e *Saccharum barberi* Jeswiet.

Saccharum barberi e *S. sinense* têm estado em cultivo desde tempos pré-históricos no norte da Índia e China, respectivamente, de onde supõe-se seus centros de origem. Tratam-se de espécies de morfologia parecida e provável origem genética comum (DANIELS; ROACH, 1987).

Trabalhos em citogenética mostram que tanto *S. sinense*, conhecida com “cana da China”, quanto *S. barberi* surgiram da hibridação natural de *S. officinarum* com *S. spontaneum*. *S. sinense* possui número cromossômico $2n = 116-120$ e *S. barberi* $2n = 81-124$ (D’HONT et al., 2002).

S. barberi foi cultivada de modo mais restrito no norte da Índia, possivelmente por ser adaptada e originária daquela região. É constituída por variedades precoces, com alto teor médio de sacarose, alta porcentagem de fibra, é resistente ao frio e suscetível ao mosaico (SILVA, 2012).

S. sinense foi cultivada em algumas regiões do mundo, como Brasil (por volta de 1860), Ilhas Maurícius (por volta de 1870), Estados Unidos da América e Porto Rico (por volta de 1915). Há citações indicando tolerância ao vírus do mosaico da cana-de-açúcar em *S. sinense*, justificando a disseminação da espécie da China para as outras regiões citadas (JAMES, 2004). Seu sistema radicular é bem desenvolvido, vegetando bem em solos pobres e secos. As variedades pertencentes a esta espécie possuem colmos finos (1,8 a 2,2 cm de diâmetro), compridos (até 5 metros de altura), com baixo teor de açúcar e com internódios alongados e fibrosos (SILVA, 2012).

2.1.2.5. *Saccharum edule* Hassk.

Possui centro de origem na região de Nova Guiné e ilha de Fiji e é frequentemente citada como produto de hibridação de *S. officinarum* ou *S. robustum* com outro gênero (possivelmente *Miscanthus*). Seus citótipos mais frequentes possuem número cromossômico $2n=60, 70$ ou 80 , mas já foram relatados citótipos com até 122 cromossomos (RAO, 1987).

É uma espécie incomum que tem como principal característica a formação de inflorescências abortivas. Dessa forma, não há participação de *S. edule* em programas de melhoramento. Nas regiões citadas como centro de origem, a espécie é cultivada como um vegetal por nativos que utilizam sua inflorescência de forma compacta na alimentação (GRIVET et al., 2004; JAMES, 2004).

2.2. Diversidade genética de *Saccharum*

As diferenças entre os seres vivos baseiam-se na diversidade genética que está codificada nos genes, porém, apenas uma porção da variabilidade genética total dentro de cada espécie é utilizada em plantas comerciais (WEI; RATTEY, 2003).

O bom desempenho da cana-de-açúcar no cenário econômico brasileiro se deve, em parte, à eficiência dos programas de melhoramento que têm concentrado esforços para o lançamento de novas variedades com características agronômicas que atendam à demanda do setor sucroalcooleiro (GRIVET; ARRUDA, 2001).

Geralmente, umas das primeiras preocupações de um melhorista é a existência da variabilidade genética do germoplasma (BOREM; MIRANDA, 2005). As informações a respeito da similaridade genética podem auxiliar os melhoristas no intuito de direcionar os cruzamentos visando à obtenção das melhores combinações híbridas. Pela teoria da genética quantitativa, os pares que são mais divergentes poderiam maximizar a heterose (MELCHINGER, 1999). Assim, o conhecimento da diversidade genética entre variedades em programas de melhoramento é de fundamental importância para a organização de recursos genéticos disponíveis para a utilização destes na produção de novas variedades promissoras (PALOMINO et al., 2005).

De acordo com Hosbino et al. (2002), a importância de se conhecer a variabilidade dos acessos de um banco de germoplasma é tornar possível o acompanhamento da manutenção do mesmo durante a multiplicação dos acessos e melhorar a amostragem destes. As atividades de um banco de germoplasma são inúmeras: desde a aquisição do germoplasma, passando por sua caracterização, avaliação, distribuição, e finalmente documentação dos acessos existentes. A caracterização e a avaliação talvez sejam as mais importantes para o melhorista de plantas. O elevado nível de resolução genética e confiabilidade obtida por meio da análise com marcadores moleculares possibilitam a discriminação entre linhagens ou variedades com base genética estreita, o que é comum entre variedades comerciais (BOREM, 2005).

O interesse do melhoramento genético da cana-de-açúcar visa, basicamente, desenvolver variedades mais produtivas e com maior tolerância aos estresses abióticos, maior resistência às pragas e doenças e melhor adaptação à colheita mecanizada (ROSSETO, 2018). Entretanto, a complexidade genética decorrente de seu alto nível de poliploidia, aliada à natureza multigenica da maioria dos caracteres agrônômicos, tem dificultado parcialmente o melhoramento genético desta cultura (GRIVET; ARRUDA, 2001).

O desenvolvimento de marcadores moleculares pode auxiliar na elaboração de estratégias a serem introduzidas nos programas de melhoramento de forma a acelerar o desenvolvimento de novas variedades. Marcadores moleculares são fragmentos de DNA que permitem a distinção de indivíduos geneticamente (BOREM; SANTOS, 2004). Um marcador molecular é definido como um segmento específico do DNA que é representante ou não das diferenças em nível do genoma (FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1998), e oferecem numerosas vantagens em relação às alternativas convencionais baseadas no fenótipo, pois são estáveis e detectáveis em todos os tecidos independentemente do estágio da planta e não ser confundido com efeitos ambientais (AGARWAL et al., 2008). Dessa forma, diferentes tipos de marcadores estão sendo utilizados para a construção de um mapa genético bem detalhado, na caracterização de genitores utilizados em cruzamentos nos diversos programas genéticos da cultura (OLIVEIRA et al., 2009; SILVA et al., 2012).

Dentre os principais tipos de marcadores moleculares disponíveis para plantas, marcadores do tipo ISSR (*Inter Simple Sequence Repeats*) vêm sendo usados para a diferenciação rápida entre indivíduos aparentados, devido ao elevado grau de polimorfismo, alta reprodutibilidade e baixo custo (BORBA et al., 2005).

A caracterização molecular de 14 cultivares de cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum*), empregadas em programas de melhoramento desenvolvidos pela Rede Interuniversitária de Desenvolvimento do Setor Sucroalcooleiro – RIDESA, por meio de marcadores moleculares ISSR, demonstrou que oito primers foram eficientes na amplificação do DNA das amostras analisadas, sendo sete primers suficientes para distinguir todas as cultivares de cana-de-açúcar envolvidas nas análises (ALMEIDA et al., 2009).

Srivastava e Gupta (2008) utilizaram o potencial de marcadores ISSR para avaliar o perfil molecular em 42 variedades de cana-de-açúcar da Índia subtropical, e observaram que a amplificação do ISSR mostrou-se um método valioso para determinar a variabilidade genética entre as variedades e para identificação de cultivares.

Objetivando caracterizar 81 genótipos de cana-de-açúcar utilizando 13 primers ISSR, Devarumath et al. (2012) concluíram que a amplificação ISSR mostrou-se um método valioso para avaliar a diversidade genética entre o complexo de cana-de-açúcar e suas variedades silvestres relacionadas, e para a identificação das cultivares.

Rao et al. (2016) utilizaram 19 primers ISSR para analisar a diversidade genética de 14 genótipos de cana-de-açúcar do Instituto de Melhoramento de Cana-de-açúcar, em Haryana na Índia, e revelaram que o conhecimento adquirido no estudo seria útil para futuros programas de melhoramento genético para aumentar a diversidade genética de variedades e cultivares de cana-de-açúcar, para atender à crescente demanda da cultura para fabricação de açúcar e para bioenergia.

2.3. Estresses abióticos em plantas

Do ponto de vista fisiológico, estresse é a condição causada por fatores que tendem a alterar um equilíbrio (NILSEN; ORCUTT, 1996). Para Taiz e Zeiger (2013) o termo estresse geralmente é definido como um fator externo, que exerce uma influência desvantajosa sobre a planta.

Características da planta, incluindo identidade do órgão ou tecido, estágio de desenvolvimento e genótipo, influenciam a resposta ao estresse. A capacidade para sobreviver ao estresse é regida por mecanismos que conferem resistência e podem ser escape ou tolerância. Os mecanismos de escape envolvem reduzida atividade metabólica, levando a um estado de dormência, evitando a exposição ao estresse. Os mecanismos de tolerância, por sua vez, envolvem alta atividade metabólica sob estresse moderado, e baixa sob estresse severo, permitindo a planta suportar o estresse (BRAY et al., 2000; CAMARA; WILLADINO, 2005).

Uma planta pode ter vários mecanismos de tolerância e escape, ou uma combinação de ambos. Se a tolerância ocorre a um nível de resistência geneticamente determinado, adquirido por processo de seleção durante muitas gerações, diz-se que a planta está adaptada. Já se a tolerância aumenta como consequência de exposição anterior ao estresse, diz-se que a planta está aclimatada (TAIZ; ZEIGER, 2013). Durante a aclimação um organismo altera sua homeostase para se acomodar a mudanças ambientais externas. A aclimação é uma resposta fenotípica a diferentes combinações de características ambientais (NILSEN; ORCUTT, 1996). A adaptação e a aclimação aos estresses ambientais resultam de eventos integrados que ocorrem em todos os níveis de organização: anatômico, morfológico, celular, bioquímico e molecular (TAIZ; ZEIGER, 2013).

Os estresses abióticos em plantas têm despertado grande interesse da pesquisa, que tem buscado incessantemente por cultivares mais produtivas sob condições desfavoráveis de cultivo. A deficiência hídrica e a salinidade do solo são os mais estudados, em razão de seus fortes impactos sobre o crescimento e a produtividade das plantas (FILIPPOU et al., 2014).

2.3.1. Estresse hídrico em cana-de-açúcar

A água é o principal constituinte vegetal, representando cerca de 90% da massa de matéria verde, sendo necessária como reagente no metabolismo vegetal, transporte e translocação de solutos, na turgescência celular, na abertura e fechamento dos estômatos e na penetração do sistema radicular, além de ser o fator mais limitante para a produtividade agrícola, uma vez que constitui a matriz e o meio onde ocorre a maioria dos processos bioquímicos essenciais à vida (TAIZ; ZEIGER, 2013).

A deficiência hídrica pode ser definida como todo o conteúdo de água de um tecido ou célula que está abaixo do conteúdo de água mais alto exibido no estado de maior hidratação. A deficiência hídrica é um dos fatores de estresse que causa maiores danos e mudanças nos processos fisiológicos e metabólicos das plantas, acarretando em reduções na produtividade (FAROOK et al., 2009; TAIZ; ZEIGER, 2013).

A habilidade das espécies para lidar com o déficit hídrico é um importante determinante na distribuição natural das plantas e na produtividade das culturas agrícolas. Em linhas gerais, a tolerância à seca está envolvida com a habilidade de uma planta viver, crescer e se reproduzir satisfatoriamente em condições limitantes de água disponível (SOUZA, 2012).

Estratégias de tolerância podem ser divididas em mecanismos de resistência e de proteção, que permitem que as plantas sobrevivam à desidratação e que desenvolvam hábitos que previnam sua exposição à desidratação, como maior profundidade das raízes ou diminuição da parte aérea (KANTAR et al., 2011).

Sendo a cana uma planta de metabolismo C4, isto é, considerada altamente eficiente na conversão de energia radiante em energia química (primeiro composto orgânico formado da fotossíntese é uma molécula de quatro carbonos), os processos de bioconversão de energia na cana-de-açúcar são mais efetivamente afetados pelos parâmetros ambientais: luz (intensidade e

quantidade), concentração de CO₂, disponibilidade de água, nutrientes e temperatura (MAGRO et al., 2011).

Existe grande variabilidade no que diz respeito à tolerância ao déficit hídrico entre as espécies e, mesmo dentro de uma mesma espécie, entre variedades. Além disso, o estado fenológico em que ocorre o estresse é crítico para a produtividade agrícola. Em cana-de-açúcar, quatro estágios distintos de crescimento têm sido caracterizados: germinação, perfilhamento, grande crescimento e maturação. As fases de perfilhamento juntamente com a de grande crescimento, também conhecidas como fase de formação, têm sido identificadas como um período crítico por demanda de água (RAMESH, 2000). Portanto, é neste período onde os danos causados pela deficiência hídrica são mais prejudiciais à produção. Isso ocorre, principalmente, porque nessa fase são produzidos 70-80% de toda a biomassa acumulada durante o ciclo da cultura (OLIVEIRA et al., 2010b).

A resposta ao déficit hídrico em plantas tem início a partir de uma complexa via de respostas, logo após a percepção do estresse, o qual desencadeia uma cascata de eventos moleculares, sendo finalizada em vários níveis de respostas fisiológicas, metabólicas e de desenvolvimento (SOUZA, 2012).

Variações na disponibilidade de água no solo promovem diferenças no desenvolvimento do sistema radicular das plantas, afetando a absorção de nutrientes. O déficit hídrico estimula a expansão do sistema radicular para zonas mais profundas e úmidas do perfil do solo, e sistema radicular profundo é característica de cultivares tolerantes à seca (GRAÇA, 2009; TAIZ; ZEIGER, 2013).

O fechamento precoce de estômatos é uma das primeiras respostas de tolerância à seca. O rápido fechamento estomático é uma característica desejável e variável em genótipos de cana-de-açúcar, sendo causado pela eficiente sinalização entre as raízes e as folhas (MACHADO, 2009). Essa resposta adaptativa visa à manutenção da hidratação da planta, evitando em primeira instância alterações significativas no metabolismo vegetal.

Além da restrição da transpiração pelo fechamento parcial dos estômatos, as plantas de cana-de-açúcar, em condições de baixa disponibilidade hídrica, apresentam redução da área foliar exposta. A capacidade de reduzir a transpiração permite que as plantas tenham melhor gestão da água disponível no solo. Uma característica muito comum em cana-de-açúcar, para diminuir a superfície de transpiração, é a ocorrência do enrolamento da folha, pois, em condições de deficiência hídrica, as células buliformes presentes na face adaxial das folhas perdem pressão de turgor, provocando o enrolamento. O grau de enrolamento das folhas pode variar consideravelmente entre os genótipos de cana-de-açúcar de acordo com a tolerância; mas essa aparência muda rapidamente quando estas plantas são irrigadas novamente (INMAN-BAMBER; SMITH, 2005).

As folhas são órgãos responsáveis por 90% da massa seca acumulada nas plantas, resultante da atividade fotossintética, assim, pequena redução no potencial de água do solo, causa diminuição da área foliar. Além do mais, quando aumenta o declínio da disponibilidade de água no solo, o potencial de água na folha (Ψ_w) diminui, levando à perda da turgescência (TAVARES, 2009). Essa sensibilidade deve-se à redução da divisão celular consequente do impacto da falta de água sobre a taxa de expansão das células, devido à perda de turgor (TAIZ; ZEIGER, 2013). Neste sentido, Oliveira et al. (2007) descrevem que em condições de estresse ambientais, genótipos sensíveis seriam mais prejudicados por reduzirem sua área foliar e massa de folhas, e que estudos da área foliar em variedades de cana-de-açúcar permitem correlacioná-la com o potencial produtivo das mesmas.

Assim, a deficiência hídrica na fase inicial afeta o rendimento da cana, reduzindo o tamanho das plantas em geral, e algumas variáveis como a produção de perfilhos; número, altura e diâmetro de colmos industrializáveis; área foliar e finalmente o peso individual dos colmos (ROBERTSON et al., 1999; RAO et al., 2005). Segundo Silva et al. (2008), a variação na altura da planta é um indicativo de tolerância ou susceptibilidade da cana-de-açúcar à deficiência hídrica. O baixo teor de umidade nos tecidos pode reduzir pela metade o

comprimento de alguns entrenós, mas se houver disponibilidade de água novamente, a perda pode ser recompensada pelo maior comprimento dos entrenós seguintes (CASTRO; KLUGE, 2001). Esta característica morfológica observada com o período de estiagem é o “encarretelamento” dos colmos, ou seja, a formação de nós e entrenós muito curtos e próximos entre si, diminuindo o volume do parênquima para armazenamento de sacarose (SEGATO et al., 2006).

À medida que a deficiência hídrica torna-se mais severa, com o decorrer da seca, o processo fotossintético passa a ser limitado pela menor difusão de CO_2 no mesófilo (LAWLOR, 2002).

Consequentemente à redução da fotossíntese, há alterações no conteúdo de fotoassimilados (carboidratos foliares), que seriam requeridos para a expansão foliar, sendo essas mudanças relacionadas à ativação de respostas para enfrentar essa condição ambiental adversa (PIMENTEL, 2004). A redução do conteúdo de amido devido à menor fotossíntese e à respiração de manutenção (KRAMER; BOYER, 1995) ocasionará aumento no conteúdo de açúcares solúveis (devido à hidrólise do amido previamente armazenado), aminoácidos e ácidos orgânicos, em condição de seca. Assim, se o estresse ocorre na fase de maturação da cana-de-açúcar, o rendimento de sacarose é aumentado (INMAN-BAMBER; SMITH, 2005). Estudos constataram aumento na atividade da sacarose fosfato sintase em plantas submetidas ao déficit hídrico (FRESNEAU et al., 2007), o que também justificaria o aumento do conteúdo de sacarose em condição de seca. Durante períodos de estresse, as plantas de cana-de-açúcar sintetizam ainda outros solutos (solutos compatíveis), como a prolina, que tem função osmoprotetora nas células, estabilizando as funções e estruturas (ERRABII et al., 2006) e mantendo a absorção de água e o turgor das mesmas (MOLINARI et al., 2007).

O aminoácido prolina é um dos osmólitos mais pesquisados em plantas cultivadas em razão de sua sensibilidade de resposta às condições de estresse abióticos, tais como: temperatura extrema, seca, salinidade e metais pesados, podendo aumentar em até cem vezes em comparação com plantas normais, fornecendo, dessa forma, um importante parâmetro para a seleção de plantas resistentes (VERBRUGGEN; HERMANS, 2008). O seu acúmulo em plantas sob estresse hídrico e salino é conhecido como um mecanismo adaptativo ao estresse. Munns et al. (2006) afirmam que a prolina tem dois papéis funcionais: altas concentrações indicam ajuste osmótico e baixas concentrações indicam efeito protetor.

Além disso, degradação do pigmento fotossintético e aumento da atividade de enzimas antioxidantes (superóxido dismutase, catalase, peroxidase de ascorbato e glutathione redutase) também têm sido observados como estratégias para reduzir os efeitos causados pelo estresse hídrico em cana (CHA-UM; KIRDMANEE, 2009; PATADE et al., 2012).

2.3.2. Estresse salino em cana-de-açúcar

A salinidade do solo é um dos fatores de maior preocupação na agricultura moderna. De um modo geral, um solo é considerado salino quando a quantidade de sais existente é capaz de prejudicar o desenvolvimento das plantas. Para a maioria das culturas isso ocorre quando a condutividade elétrica do extrato de saturação (ECe) é igual ou superior a 4 dS.m^{-1} , que corresponde a cerca de 40 mM de NaCl (HOLANDA et al., 2010).

A salinidade é uma condição do solo que ocorre principalmente nas regiões áridas e semiáridas do mundo. A baixa precipitação pluviométrica e a elevada taxa de evaporação têm contribuído para ocorrência do processo de salinização e/ou sodificação dos solos nessas regiões, uma vez que os sais não são lixiviados acumulam-se em grandes quantidades no solo, e consequentemente dificultam o desenvolvimento das plantas cultivadas (SMITH et al., 2009).

Os problemas de salinidade têm sido também associados à água utilizada na irrigação, à drenagem deficiente e à presença de águas subsuperficiais ricas em sais solúveis. A prática da irrigação nas regiões áridas e semiáridas é indispensável devido à ocorrência do déficit hídrico para culturas na época seca e essencial para aumentar a produção agrícola para satisfazer as

necessidades alimentares. Entretanto, nestas regiões é comum a ocorrência de fontes de água com elevados teores de sais (FAO, 2018).

Além de se caracterizar como um grave problema ambiental, a elevada concentração de sais no solo causa perdas consideráveis para agricultura mundial, causando perdas em cultivos já estabelecidos, ou inviabilizando a exploração de novas áreas agricultáveis (FLOWERS, 2004; MUNNS et al., 2006).

As respostas ao estresse salino variam amplamente dependendo do genótipo da planta. A tolerância à salinidade de plantas é a capacidade de desenvolverem e completarem seu ciclo de vida sobre um substrato que contém elevada concentração de sais solúveis. Plantas que podem se desenvolver naturalmente e tolerar elevadas quantidades de sais na rizosfera sem afetar seu crescimento são denominadas halófitas. Já plantas que não conseguem desenvolver-se em ambientes com elevado conteúdo de sais solúveis são as glicófitas. A principal vantagem das halófitas sobre as glicófitas advém da maior eficiência em acumular e compartimentar os solutos (FLOWERS et al., 1977; ORCUTT; NILSEN, 2000).

Muitas espécies vegetais se mostram sensíveis a valores de condutividade elétrica de 3 dS.m⁻¹, sendo essa quantidade de sal suficiente para promover queda da produtividade agrícola. Espécies como milho e trigo são consideradas moderadamente tolerantes ao estresse salino, pois sobrevivem e são produtivas em solos com E_Ce de 10 dS.m⁻¹, enquanto que a cevada é produtiva em concentrações de sal 2,5 vezes maiores, sendo classificada como uma espécie tolerante (MUNNS et al., 2006). Já a cana-de-açúcar é suscetível à salinidade do solo, pois valores acima de 1,7 dS.m⁻¹ são considerados prejudiciais à sobrevivência e produtividade da cultura (MASS; GRIEVE, 1990).

Os efeitos mais marcantes da salinidade sobre as plantas refletem-se em perturbações das funções fisiológicas e bioquímicas destas, resultando em alterações no potencial e nas relações hídricas, na toxicidade iônica e na absorção e na utilização de nutrientes essenciais para as plantas, retardando seu crescimento e reduzindo a produção (AMORIM et al., 2010; VASANTHA; GOMATHI, 2012).

Geralmente, o primeiro efeito da salinidade no desenvolvimento das plantas é a redução no crescimento, provocado pelo decréscimo no potencial hídrico da solução do solo a nível abaixo do necessário para que ocorra a absorção de água pelas células das raízes, impedindo, por conseguinte, a expansão celular, visto que o potencial de pressão da célula tende a se igualar com o do solo (TAIZ; ZEIGER, 2013). Além disso, a salinidade reduz a condutividade hidráulica das raízes limitando o fluxo de água e sais para a parte aérea. Posteriormente, o acúmulo excessivo de sais pode levar à morte dos tecidos, órgãos e mesmo da planta inteira. A causa desta injúria é função da elevada quantidade de sal absorvida (íons Na⁺ e Cl⁻ acumulados nas células), a qual ultrapassa a capacidade da planta de compartimentalizá-lo no vacúolo (OLIVEIRA et al., 2010a).

As respostas das plantas à salinidade ocorrem tanto a nível celular quanto da planta como um todo. Tais respostas incluem o acúmulo seletivo ou a exclusão de íons, o controle na absorção dos íons pelas raízes, a síntese e acúmulo de solutos compatíveis, mudanças na rota fotossintética, alteração na estrutura das membranas, indução de enzimas antioxidantes e de hormônios vegetais (PARIDA; DAS, 2005).

Portanto, para tentar compreender o processo de tolerância, devem ser levadas em consideração as variações fisiológicas, bioquímicas e genéticas para as cultivares, e o entendimento dos efeitos causados pelo estresse salino aos tecidos vegetais e como as plantas respondem a esse estímulo ambiental.

Regiões salinas cultivadas com cana geralmente são locais onde se pratica a irrigação ao longo do desenvolvimento da cultura, como regiões do Nordeste e Centro-Oeste do país. Alguns estudos identificaram variedades de cana-de-açúcar de *S. officinarum* mais tolerantes quando cultivadas em solos salinos, isso se deve aos mecanismos desenvolvidos pela espécie para minimizar o efeito osmótico dos sais no solo, os quais limitam a absorção de água, além de ser menos vulnerável às concentrações tóxicas de íons como Na⁺ e Cl⁻ (SANTANA et al.,

2007; WAHID; GHAZANFAR, 2006). Os efeitos da salinidade sobre a cana-de-açúcar se manifestam com restrições na assimilação do CO₂ (VASANTHA et al., 2010), queda no teor de clorofila (SILVA et al., 2010), redução da pressão de turgor limitando o alongamento e a divisão celular (TAIZ; ZEIGER, 2013; SIMÕES et al., 2016), acúmulo de compostos conhecidos como espécies reativas de oxigênio (WILLADINO et al., 2011), dentre outros fatores que refletem diretamente na depleção do crescimento das plantas. Já a tolerância está ligada ao nível elevado de defesa antioxidante (PATADE et al., 2011), e pelo seu menor nível de peroxidação de lipídeos, superior estabilidade da membrana e maior acúmulo de prolina e glicina betaína (SATBHAI; NAIK, 2014).

2.4. Cultura de tecidos de plantas

Nos últimos anos a cultura de tecidos vegetais vem se destacando mundialmente frente ao conhecimento científico e tecnológico. Caracterizada como ferramenta biotecnológica, sua evolução se deve, primordialmente, pelo seu caráter multidisciplinar (GEORGE, 2008), tendo sido muito útil para a avaliação de tolerância a estresses ambientais, por estes poderem ser facilmente controlados *in vitro* (ALTMAN et al., 2007).

A identificação de características morfofisiológicas, bioquímicas e moleculares, observadas durante o processo de adaptação das plantas aos estresses, tem auxiliado na produção de plantas mais tolerantes, seja através do melhoramento genético convencional ou da engenharia genética (BHATNAGAR-MATHUR et al., 2008).

Plantas submetidas aos estresses salino e hídrico tendem a acumular solutos compatíveis no citosol, ou seja, compostos altamente solúveis e não tóxicos em concentrações elevadas, sendo responsáveis por auxiliar na manutenção do turgor celular (MARIJUAN; BOSCH, 2013). O osmoprotetor mais comum e mais estudado é a prolina. Em plantas sob estresse, o conteúdo de prolina pode aumentar até 100 vezes, em comparação ao observado em plantas cultivadas sob condições normais (VERBRUGGEN; HERMANS, 2008).

Em culturas de cana-de-açúcar *in vitro* submetidas ao estresse tem sido constatado o aumento na produção de prolina. Em estudo realizado por Cha-um e Kirdmanee (2008), foi avaliado o conteúdo de prolina nas folhas de plântulas mantidas sob estresse hídrico utilizando manitol. Os autores concluíram que teor desse aminoácido aumentava em decorrência do aumento da concentração de manitol no meio de cultura. O aumento no teor de prolina também foi relatado nos trabalhos de Avinash et al. (2012), Cha-um e Kirdmanee (2009), Poonsawat et al. (2015).

Adicionalmente, alguns trabalhos têm sido realizados para estudar os efeitos fisiológicos e bioquímicos da salinidade e do estresse por déficit hídrico *in vitro*, e suas respostas a nível celular em cana-de-açúcar. Patade et al. (2012), avaliaram calos de cana-de-açúcar submetidos à salinidade (NaCl 150 mM) e estresse iso-osmótico de PEG e, analisaram um comparativo sobre mudanças no crescimento, no acúmulo de osmoprotetores e nas atividades de enzimas antioxidantes. Esses mesmos autores em 2008 ainda estudaram a variedade CoC-671, e suas respostas fisiológicas e bioquímicas em termos de viabilidade celular, e o acúmulo de prolina, glicina betaína, Na⁺ e K⁺ em calos embriogênicos. Trabalhos semelhantes foram realizados por Begum et al. (2011), Errabii et al. (2006; 2007) e Manchanda et al. (2014).

Outro enfoque tem sido estudos associando salinidade e estresse hídrico com tecnologias como biorreatores e ferramentas moleculares. Gómez et al. (2017), trabalhando com salinidade de cana-de-açúcar em biorreatores de imersão temporária, observaram que a adição de NaCl reduziu a taxa de multiplicação da parte aérea, a massa fresca, os teores de carotenoides, outros aldeídos e fenólicos solúveis nas plantas, e induziu aumento nos fenólicos solúveis no meio de cultura, concluindo que a pesquisa pode ser útil para futuros experimentos de seleção *in vitro* de novos materiais genéticos de cana-de-açúcar com tolerância a NaCl.

Já Khalil et al. (2018) enfatizaram que a criação de mutações é uma das ferramentas promissoras disponíveis para produzir plantas resistentes ao estresse, com a indução de novos alelos devido à mutação pontual no germoplasma de cana-de-açúcar existente. Em seu trabalho

direcionado a mutagenizar quimicamente os calos de duas cultivares de cana-de-açúcar (ROC22 e FN39), das plantas regeneradas e expostas a 28% de estresse osmótico estimulado por PEG-6000, as que sobreviveram foram submetidas a testes preliminares em estufa para confirmar a tolerância à seca, analisando parâmetros fisiológicos, diversidade genética através de marcadores SSR e digestão com enzimas de restrição para verificar os locais mutados. Em suma, os autores confirmaram que linhas mutantes de ROC22 foram considerados promissoras para o futuro melhoramento de resistência à seca, para melhor adaptação fisiológica sob estresse hídrico.

3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGARWAL, M.; SHRIVASTAVA, N.; PADH, H. Advances in molecular marker techniques and their applications in plant sciences. **Plant Cell Reports**, v.27, n.4, p.617-631, 2008.
- ALMEIDA, C.M.A.; LIMA, S.E.M.; LIMA, G.S.A.; BRITO, J.Z.; DONATO, V.M.T.S.; SILVA, M.V. Caracterização molecular de cultivares de cana-de-açúcar utilizando marcadores ISSR. **Ciência e Agrotecnologia**, v.33, p.1771-1776, 2009.
- ALTMAN, A.; TREVOR, THORPE A. **Plant tissue culture and biotechnology: perspectives in the history of IAPTC/IAPTC&B/IAPB**. Fonte: IAPB 2014. Org/about/History, 2007.
- AMORIM, A.V.; GOMES-FILHO, E.; BEZERRA, M.A.; PRISCO, J.T.; LACER-DA, C.F. Respostas fisiológicas de plantas adultas de cajueiro anão precoce à salinidade. **Revista Ciência Agronômica**, v.41, p.113-121, 2010.
- AVINASH, L.; PRASHANT, N.; BHAROSE, A.A. *In vitro* screening of sugarcane cultivar Co 86032 for salinity tolerance. **Journal of Sugarcane Research**, v.2, p.25-31, 2012.
- AZEVEDO, R.A.; LEA, P.J. Research on abiotic and biotic stress - what next? **Annals of Applied Biology**, v.159, p.317-319, 2011.
- BEGUM, M.; ISLAM, M.; MIAH, M.; HOSSAIN, M.; ISLAM, N. Production of somaclone *in vitro* for drought stress tolerant plantlet selection in sugarcane (*Saccharum officinarum* L.). **The Agriculturists**, v.9, n.1-2, p.18-28, 2011.
- BHATNAGAR-MATHUR, P.; VADEZ, V.; SHARMA, K.K. Transgenic approaches for abiotic stress tolerance in plants: retrospect and prospects. **Plant Cell Reports**, v.27, p.411-424, 2008.
- BORBA, R.S.; GARCIA, M.S.; KOVALLESKI, A.; OLIVEIRA, A.C.; ZZIMMER, P.D.; BRANCO, J.S.C.; MALONE, G. Dissimilaridade genética de linhagens de *Trichogramma westwood* (Hymenoptera: Trichogrammatidae) através de marcadores moleculares ISSR. **Neotropical Entomology**, v.34, p.565-569, 2005.
- BORÉM, A. **Melhoramento de espécies cultivadas**. Viçosa: UFV, 2005. 969p.
- BORÉM, A.; MIRANDA, G.V. **Melhoramento de Plantas**. 4.ed. Viçosa: UFV, 2005, 525 p.
- BORÉM, A.; SANTOS, F.R. **Biotechnologia Simplificada**. 2.ed. Visconde do Rio Branco: Suprema, 2004. V.1.
- BRAY, E.A.; BAILEY-SERRES, J.; WERETILNYK, E. Responses to abiotic stresses. In: BUCHANAN, B.B.; GRUISSEM, W. JONES, R.L. (eds). **Biochemistry & Molecular Biology of Plants**. Rockville: American Society of Plant Physiologists, p.1158-1203, 2000.
- CAMARA, T.R.; WILLADINO, L. Compreendendo o estresse abiótico *in vitro*. In: NOGUEIRA, R.J.M.C.; ARAÚJO, E. DE L.; WILLADINO, L.; CAVALCANTE, U.M.T. (eds). **Estresses ambientais: danos e benefícios em plantas**. Recife. MXM Gráfica e Editora, 2005. p.325-335.
- CARR, M.K.V.; KNOX, J.W. The water relations and irrigation requirements of sugar cane (*Saccharum officinarum*): a review. **Experimental Agriculture**, v.47, p.1-25, 2011.

CARVALHO, S.A.D; FURTADO, A.T. O melhoramento genético de cana-de-açúcar no Brasil e o desafio das mudanças climáticas globais. **Gestão & Conexões: Management and Connections Journal**, v.2, n.1, p.22-46, 2013.

CASTRO, P.R.C.; KLUGE, R.A. **Ecofisiologia de culturas extrativistas: cana-de-açúcar; seringueira; coqueiro; dendezeiro e oliveira**. Cosmópolis: Stoller do Brasil, 2001. 138 p.

CHA-UM, S.; KIRDMANEE, C. Effect of osmotic stress on proline accumulation, photosynthetic abilities and growth of sugarcane plantlets (*Saccharum officinarum* L.). **Pakistan Journal of Botany**, v.40, n.6, p.2541-2552, 2008.

CHA-UM, S.; KIRDMANEE, C. Proline accumulation, photosynthetic abilities and growth characters of sugarcane (*Saccharum officinarum* L.) plantlets in response to iso-osmotic salt and water-deficit stress. **Agricultural Sciences in China**, v.8, n.1, p.51-58, 2009.

COSTA, P.R.O.; DUARTE, F.S. A utilização da biomassa da cana-de-açúcar como fonte de energia renovável aplicada no setor sucroalcooleiro. **Revista de Administração da Fatea**, v.3, n.3, p.102-107, 2010.

CONAB. COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO - Acompanhamento da safra brasileira de cana-de-açúcar, v. 4 - Safra 2017/18, n. 4 - Quarto levantamento, Brasília, p. 1-73 2018.

DANIELS, J.; ROACH, B.T. Taxonomy and evolution. In: HEINZZ, D.J. ed. **Sugarcane improvement through breeding**, v.11, p. 7-84, 1987.

DANIELS, J.; SMITH, P.; PATON, N.; WILLIAMS, C.A. The origin of the genus *Saccharum*. **Sugarcane Breeding Newslette**, v.36, p.24-39, 1975.

DEVARUMATH, B.M.; KALWADE, S.B.; KAWAR, P.G.; SUSHIR, K.V. Assesment of genetic diversity in sugarcane germoplasm using ISSR and SSR markers. **Sugar Tech**, v.14, n.4, p.334-344, 2012.

D'HONT, A.; PAULET, F.; GLASZMANN, J.C. Oligoclonal interspecific origin of North Indian and Chinese sugarcanes. **Chromosome Research**, v.10, p.253-262, 2002.

EMBRAPA¹. **Árvore do conhecimento agroenergia**. Disponível em: <<http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/gestor/agroenergia/arvore/CONT000fj1ma9ra02wyiv802hvm3jqrdq8ps.html>> Acesso em: 04 de ago. de 2018.

EMBRAPA². **Árvore do conhecimento cana-de-açúcar**. Disponível em: <http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/gestor/cana-de-acucar/arvore/CONTAG01_18_3112006152934.html> Acesso em: 04 de ago. de 2018.

ERRABII, T.; GANDONOU, C.B.; ESSALMANI, H.; ABRINI, J.; IDAOMAR, M.; SKALI-SENHAJI, N. Growth, proline and ion accumulation in sugarcane callus cultures under drought-induced osmotic stress and its subsequent relief. **African Journal of Biotechnology**, v.5, n.16, p.1488-1493, 2006.

ERRABII, T.; GANDONOU, C.B.; ESSALMANI, H.; ABRINI, J.; IDAOMAR, M.; SKALI-SENHAJI, N. Effects os NaCl and mannitol induced stress on sugarcane (*Saccharum* sp.) callus cultures. **Acta Physiology Plant**, v.29, p.95-102, 2007.

FAO - FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS. Disponível em: < <http://www.fao.org/tc/exact/sustainable-agriculture-platform-pilot-website/soil-salinity-management/en/> > Acesso em: 03 de ago. de 2018.

FAUCONNIER, R. **Sugar cane**. London: Macmillan Press Ltd, 1993. p.1-140.

FAROOK, M.; WAHID, A.; KOBAYASHI, N.; FUJITA, D.; BASRA, S.M.A. Plant drought stress: effects, mechanisms and management. **Agronomy for Sustainable Development**, v.29, p.185-212, 2009.

FERREIRA, F. **Caracterização cromossômica em cana-de-açúcar (*Saccharum spp.*, Poaceae)**. 2010. 94 f. Dissertação (Mestrado em Biologia Vegetal) - Universidade Estadual de Campinas, Campinas-SP, 2010.

FERREIRA, M.E.; GRATAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética**. 3.ed. Brasília: EMBRAPA-CENARGEN, 1998. p.220.

FIGUEIREDO, P. Breve história da cana-de-açúcar e do papel do instituto agrônomo no seu estabelecimento no Brasil. In: DINARDO-MIRANDA, L.L; VASCONCELOS, A.C.M.; LANDELL, M.G.A.(Eds.). **Cana-de-açúcar**. Ribeirão Preto: IAC, 2008.

FILIPPOU, P.; BOUCHAGIER, P.; SKOTTI, E.; FOTOPOULOS, V. Proline and reactive oxygen/nitrogen species metabolism is involved in the tolerant response of the invasive plant species *Ailanthus altissima* to drought and salinity. **Environmental and Experimental Botany**, v.97, p.1-10, 2014.

FLOWERS, T.J. Improving crop salt tolerance. **Journal of Experimental Botany**, v.55, n.369, p.307-319, 2004.

FLOWERS, T.J.; TROKE, P.F.; YEO, A.R. The mechanism of salt tolerance in halophytes. **Annual Review of Plant Physiology**, v.28, p.89-121, 1977.

FRESNEAU, C.; GHASHGHAIE, J.; CORNIC, G. Drought effect on nitrate reductase and sucrose-phosphate synthase activities in wheat (*Triticum durum* L.): role of leaf internal CO₂. **Journal of Experimental Botany**, v.58, p. 2983-2992, 2007.

GEORGE, E.F.; HALL, M.A.; KLERK, G.J. **Plant propagation by tissue culture**. 3 Ed. Dordrecht: The background, v.1, 501p, 2008.

GOMÉZ, D.; HERNÁNDEZ, L.; VALLE, B.; MARTÍNEZ, J.; CID, M.; ESCALONA, M.; HERNÁNDEZ, M.; YABOR, L.; BEEMSTER, G.T.S.; TEBBE, C.C.; PAPENBROCK, J.; LORENZO, J.C. Salinity induces specific metabolic changes in sugarcane shoot eplants in temporary immersion bioreactors. **Journal of Applied Botany and Food Quality**, v.90, p.354-358, 2017.

GRAÇA, J.P. **Avaliação de parâmetros fisiológicos em cultivares de cana-de-açúcar submetidas ao déficit hídrico**. 2009. 52f. Dissertação de Mestrado – UNESP, Jaboticabal-SP, 2009.

GRIVET, L.; ARRUDA, P. Sugarcane genomics: depicting the complex genome of an important tropical crop. **Current Opinion in Plant Biology**, v.5, n.1, p.122-127, 2001.

GRIVET, L.; DANIELS, C.; GLASZMANN, J.C.; D'HONT, A. A review of recente molecular genetics evidence for sugarcane evolution and domestication. **Ethnobotany Research and Applications**, v.2, p.9-17, 2004.

HOLANDA, A.C.; SANTOS, R.V.; SOUTO, J.S.; ALVES, A.R. Desenvolvimento inicial de espécies arbóreas em ambientes degradados por sais. **Revista de Biologia e Ciências da Terra**, v.7, n.1, p.39-50, 2007.

HOLANDA, J.S.; AMORIM, J.R.A.; FERREIRA NETO, M.; HOLANDA, A.C. Qualidade da água para irrigação. In: GHEYI, H. R.; DIAS, N. S.; LACERDA, C.F. (Eds) **Manejo da salinidade na agricultura: estudos básicos e aplicados**. Fortaleza: Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em Salinidade, p. 43-61, 2010.

HOSBINO, A.A.; PALARIERI, D.A.; BRAVO, J.P.; PEREIRA, T.E.B.; LOPES, G.R. Marcador microsatélite na conservação de germoplasma vegetal. **Biotechnologia Ciência e Desenvolvimento**, n.29, 2002.

INMAN-BAMBER, N.G; SMITH, D.M. Water relations in sugarcane and response to water deficits. **Field Crops Research**, v.92, n.2-3, p.185-202, 2005.

JAMES, G.L. An introduction to sugarcane. In: JAMES, G.L. (Ed.). **Sugarcane**. Oxford: Blackwell Publishing, 2004.

KANTAR, M.; LUCAS, S.J.; BUDAKI, H. Drought Stress: Molecular Genetics and Genomics Approaches. **Plant responses to drought and salinity stress: developments in a post-genomic era**, v.57, p.445-493, 2011.

KHALIL, F.; NAIYAN, X.; TAYYAB, M.; PINGHUA, C. Screening of EMS-Induced Drought-tolerant sugarcane mutants employing physiological, molecular and enzymatic approaches. **Agronomy**, v.8, p.226, 2018.

KRAMER, P.J.; BOYER, J.S. **Water relations of plants and soils**. Academic Press, New York, 1995, 495p.

LANDELL, M.G.A.; BRESSIANI, J.A. Melhoramento genético, caracterização e manejo varietal. In: DINARDO-MIRANDA, L.L; VASCONCELOS, A.C.M.; LANDELL, M.G.A. (Eds.). **Cana-de-açúcar**. Ribeirão Preto: IAC, 2008. p.101-155.

LAWLOR, D.W. Limitation to photosynthesis in water-stressed leaves: stomata vs. metabolism and the role of ATP. **Annals of Botany**, v.89, p.871-885, 2002.

MAAS, E.V.; GRIEVE, C.M. Spike and leaf development in saltstressed wheat. **Crop Science**, v.30, p.1309-1313, 1990.

MACHADO, R.S. **Respostas fisiológicas de genótipos de cana-de-açúcar ao déficit hídrico imposto na fase inicial de desenvolvimento**. 2009. 64 f. Dissertação (Mestrado em Agricultura Tropical e Subtropical) – Instituto Agrônomo de Campinas, Campinas-SP, 2009.

MAGRO, F.J.; TAKAO, G.; CAMARGO, P.E.; TAKAMATSU, S.Y. **Biometria em cana-de-açúcar**. Universidade de São Paulo, Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, LPV0684-Produção de Cana-de-açúcar. Piracicaba, 2011. 18p.

- MANCHANDA, P.; KAUR, A.; KUMAR, P.; CHOUDHARY, O.P.; GOSAL, S.S. *In vitro* for drought tolerance in two elite sugarcane (*Sachharum* spp.) genotypes. **Indian Journal of Agricultural Sciences**, v. 84, n.2, p.1513-1516, 2014.
- MARIJUAN, M.P.; BOSCH, S.M. Ecophysiology of invasive plants: osmotic adjustment and antioxidants. **Trends in Plant Science**, v.18, p.660-666, 2013.
- MELCHINGER, A.E. Genetic diversity and heterosis. In: COORS, J.G.; PANDEY, S. (Ed.). **The genetics and exploitation of heterosis in crops**. Madison: ASA, 1999. p.99-118.
- MOLINARI, H.B.C; MARUR, C.J.; DAROS, E.; CAMPOS, M.K.F.; CARVALHO, J.F.R.P.; BESPALHOK FILHO, J.C.; PEREIRA, L.F.P.; VIEIRA, L.G.E. Evaluation of the stress-inducible production of proline in transgenic sugarcane (*Saccharum* spp.): osmotic adjustment, chlorophyll fluorescence and oxidative stress. **Physiologia Plantarum**, v.130, p. 218-229, 2007.
- MUNNS, R.; JAMES, R.A.; LÄUCHLI, A. Approaches to increasing the salt tolerance of wheat and other cereals. **Journal of Experimental Botany**, v.57, n.5, p.1025-1043, 2006.
- NAIDU, K.M.; SREENIVASAN, T.V. Conservation of sugarcane germplasm. In: COPERSUCAR INTERNATIONAL BREEDING WORKSHOP. Piracicaba, 1987: **Anais...**Piracicaba: Copersucar, 1987. 334p.
- NILSEN, E.T.; ORCUTT, D.M. **The physiology of plants under stress** – abiotic factors. New York: John Wiley and Sons, Inc, 1996. 704p.
- NOVACANA. Disponível em: <www.novacana.com.br>. Acesso em: 21 de maio de 2018.
- OLIVEIRA, A.B. de; GOMES-FILHO, E.; ENEAS-FILHO, J. O problema da salinidade na agricultura e as adaptações das plantas ao estresse salino. **Enciclopédia Biosfera**, v.6, n.11, 2010a.
- OLIVEIRA, K.M.; PINTO, L.R.; MARCONI, T.G.; MOLLINARI, M.; ULIAN, E.C.; CHABREGAS, S.M.; FALCO, M.; BURNQUIST, W.; GARCIA, A.A.; SOUZA, A.P. Characterization of new polymorphic funtional markers for sugarcane. **Genome**, v.52, n.2, p.191-209, 2009.
- OLIVEIRA, R.A.; DAROS, E.; ZAMBON, J.L.C.; WEBER, H.; IDO, O.T.; BESPALHOK-FILHO, J.C.; ZUFFELLATO-RIBAS, K.C.; SILVA, D.K.T. Área foliar em três cultivares de cana-de-açúcar e sua correlação com a produção de biomassa. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, v.37, n.2, p.71- 76, 2007.
- OLIVEIRA, E.C.A.; OLIVEIRA, R.I.; ANDRADE, B.M.T.; FREIRE, F.J.; JÚNIOR, M.A.L.; MACHADO, P.R. Crescimento e acúmulo de matéria seca em variedades de cana-de-açúcar cultivadas sob irrigação plena. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v.14, n.9, p.951-960, 2010b.
- ORCUTT, D.M.; NILSEN, E.T. **Physiology of Plants Under Stress**. New York, John Willey & Sons, 2000. 673p.
- PALOMINO, E.C.; MORI, E.S.; ZZIMBACK, L.; TAMBARUSSI, E.V.; MORAES, C.B. Genetic diversity of common bean genotypes of Carioca comercial group using RAPD markers. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, v.5, n.1, p.80-85, 2005.

PANGE, R.R. *Saccharum spontaneum* L. A comparative study of the forms grown at the imperial Sugarcane Breeding Station, Coimbatore. **Indian Journal of Agriculture Science**, v.3, p.1-10, 1933.

PANGE, R.R.; SRINIVASAN, K. Studies in *Saccharum spontaneum*. The geographical distribution of spikelet length. **Indian Journal Sugarcane Research & Development**, v.1, p.1-8, 1957.

PARIDA, A.K.; DAS, A.B. Salt tolerance and salinity effects on plants: a review. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v.60, n.3, p.324-349. 2005.

PATADE, V.Y.; BHARGAVA, S.; SUPRASANNA, P. Effects of NaCl and iso-osmotic PEG stress on growth, osmolytes accumulation and antioxidant defense in cultured sugarcane cells. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, v.108, p.279-286, 2012.

PATADE, V.Y.; BHARGAVA, S.; SUPRASANNA, P. Salt and drought tolerance of sugarcane under iso-osmotic salt and water stress: growth, osmolytes accumulation, and antioxidant defense. **Journal of Plant Interactions**, v.6, p.275-282, 2011.

PIMENTEL, C. **A relação da planta com a água**. Seropédica: Edur, 2004, 191p.

POONSAWAT, W.; THEERAWITAYA, C.; SUWAN, T.; MONGKOLSIRIWATANA, C.; SAMPHUMPHUANG, T.; CHA-UM, S.; KIRDMANEE, C. Regulation of some salt defense-related genes in relation to physiological and biochemical changes in three sugarcane genotypes subjected to salt stress. **Protoplasma**, v.252, p.231-243, 2015.

PRICE, S. Cytological studies in *Saccharum* and allied genera. VIII. Progenies from 112- and 136- chromosome *S. officinarum* x *S. spontaneum* hybrids. **Botanical Gazette**, v.124, p.186-190, 1963.

PURSEGLOVE, J.W. **Tropical Crops: monocotyledons**. New York: Longman Scientific and Technical, 1972. 607p.

RAMESH, P. Effect of different levels of drought during the formative phase on growth parameters and its relationship with dry matter accumulation in sugarcane. **Journal of Agronomy & Crop Science**, v.185, p.83-89, 2000.

RAMOS, P. **Agroindústria canavieira e propriedade fundiária no Brasil**. São Paulo: Ed. Hucitec, 1999. 245p.

RAO, C.M.; KUMAR, M.V.; REDDY, L.K. Management of sugarcane clones under limited moisture situations (drought) at formative stage. **Indian Sugar**, p.949-953, 2005.

RAO, J.T. Sugarcane origin, taxonomy, breeding and varieties. In: RAO, J.T. (Ed.). **Sugarcane varietal improvement**. Coimbatore: ICAR 1987.p.83-113.

RAO, J.T.; BABU, C.N. Chromosome numbers in *Saccharum spontaneum* L. **Current Science**, v.24, p.53-54, 1955.

RAO, V.P.; SINGH, S.; CHAUDHARY, R.; SHARMA, M.K.; SENGAR, R.S.; SINGH, U.M.; SHARMA, V. Genetic variability in sugarcane (*Saccharum* spp. Hybrid) genotypes through inter simple sequence repeats (ISSR) markers. **Journal of Applied and Natural Science**, v.8, n.3, p.1404-1409, 2016.

ROACH, B.T. *Saccharum spontaneum*: Utilization of wild germplasm in breeding. In: INTERNATIONAL SOCIETY OF SUGAR CANE TECHNOLOGISTS, **Proceedings...** v.16, p.233-238, 1977.

ROBERTSON, M.J.; INMAN-BAMBER, N.G.; MUCHOW, R.C.; WOOD, A.W. Physiology and productivity of sugarcane with early and midseason water deficit. **Field Crops Research**, v.64, p.211-227, 1999.

ROSSETO, R. **Melhoramento genético**. Árvore do conhecimento cana-de-açúcar. Disponível em: < http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/gestor/cana-de-acucar/arvore/CONTAG01_70_711200516719.html>. Acesso em: 20 de set. de 2018.

SANTANA, M.J.; CARVALHO, J.A.; SOUZA, A.M.G.; SOUSA, K.J.; VASCONCELOS, C.L.; ANDRADE, L.A.B. Efeitos da salinidade da água de irrigação na brotação e desenvolvimento inicial da cana-de-açúcar (*Saccharum* spp.) e em solos com diferentes níveis texturais. **Ciência e Agrotecnologia**, v.31, p.1470-1476, 2007.

SATBHAI, R.D.; NAIK, R.M. Osmolytes accumulation, cell membrane integrity, and antioxidant enzymes in sugarcane varieties differing in salinity tolerance. **Sugar Tech**, v.16, p.30-35, 2014.

SEGATO, S.V.; MATTIUZ, C.F.M.; MOZAMBANI, A.E. Aspectos fenológicos da cana-de-açúcar. In: SEGATO, S.V.; PINTO, A.S.; JENDIROBA, E. et. al. (Eds.) **Atualização em produção de cana-de-açúcar**. 1.ed. Piracicaba: Livrocere, 2006. p.19-36.

SILVA, D.C.; FILHO, L.S.C.D.; SANTOS, J.M.; BARBOSA, G.V.D.; ALMEIDA, C. DNA fingerprinting based on simple sequence repeat (SSR) markers in sugarcane clones from the breeding program RIDESA. **African Journal of Biotechnology**, v.11, n.21, p.4722-4728, 2012.

SILVA, E.N.; RIBEIRO, R.V.; FERREIRA-SILVA, S.L.; VIÉGAS, R.A.; SILVEIRA, J.A.G. Comparative effects of salinity and water stress on photosynthesis, water relations and growth of *Jatropha curcas* plants. **Journal of Arid Environments**, v.74, p.1130-1137, 2010.

SILVA, J.P.N. **Noções da cultura da cana-de-açúcar**. Inhumas: IFG; Santa Maria: Universidade Federal de Santa Maria, 2012, 105p.

SILVA, M.A.; SILVA, J.A.G.; ENCISO, J.; SHARMA, V.; JIFON, J. Yield components as indicators of drought tolerance of sugarcane. **Scientia Agricola**, v.65, n.6, p.620-627, 2008.

SIMÕES, W.L.; CALGARO, M.; COELHO, D.S.; SANTOS, D.B.; SOUZA, M.A. Growth of sugar cane varieties under salinity. **Revista Ceres**, v.63, p.265-271, 2016.

SMITH, A.P.; CHEN, D.; CHALK, P.M. N₂ fixation by faba bean (*Vicia faba* L.) in a gypsum amended sodic soil. **Biology and Fertility of Soils**, v.45, p.329-333, 2009.

SOUZA, C.B. **Biotechnologia de cana-de-açúcar (*Saccharum* spp.) para tolerância a estresse hídrico**. 2012. 150f. Tese de Doutorado (Doutorado em Genética e Biologia Molecular) - Universidade Estadual de Campinas, São Paulo-SP, 2012.

SREENIVASAN, T.V.; AHLOOWALIA, B.S.; HEINZ, D.J. Cytogenetics. Chapter 5. In: DJ Heinz, ed. **Sugarcane improvement through breeding**. Elsevier Amsterdam. 1987. p 211-253.

SRIVASTAVA, S.; GUPTA, P.S. Inter simple sequence repeat profile as a genetic marker system in sugarcane. *Sugar Tech*, v.10, n.1, p.48-52, 2008.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. 5.ed. Porto Alegre: Artemed, 2013. 954p.

TAVARES, A.C.S. **Sensibilidade da cana-de-açúcar (*Saccharum spp.*) ao excesso de água no solo**. 2009, 220 f. Tese (Doutorado em Agronomia) - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba-SP, 2009.

TSUKADA, C.Y.P.S. **Os efeitos da expansão do setor sucroalcooleiro sobre o desenvolvimento de municípios da região administrativa de Marília-SP**. 2011. 196f. Dissertação (Mestrado em Geografia) – Universidade Estadual Paulista, Presidente Prudente-SP, 2011.

UNICA. União da Indústria da Cana-de-açúcar (Produção, 2018). Disponível em: <www.unica.com.br>. Acesso em: 21 de maio de 2018.

WAHID, A.; GHAZANFAR, A. Possible involvement of some secondary metabolites in salt tolerance of sugar cane. **Journal of Plant Physiology**, v.163, p.723-730, 2006.

WEI, X.; RATTEY, A.R. **Travel to the 12th Australasian Plant Breeding Conference**. Melbourne: Bureau of Sugar Experiment Station, 2003. 24p.

WILLADINO, L.; OLIVEIRA FILHO, R.A.; SILVA JUNIOR, E.A.; GOUVEIA NETO, A.; CAMARA, T.R. Estresse salino em duas variedades de cana-de-açúcar: enzimas do sistema antioxidativo e fluorescência da clorofila. **Revista Ciência Agronômica**, v.42, n.2, p.417-422, 2011.

VASANTHA, S.; GOMATHI, R. Growth and development of sugarcane under salinity. **Journal of Sugarcane Research**, v.2, p.1-10, 2012.

VASANTHA, S.; VENKATARAMANA, S.; RAO, P.N.G.; GOMATHI, R. Long term salinity effect on growth, photosynthesis and osmotic characteristics in sugar cane. **Sugar Tech**, v.12, p.5-8, 2010.

VASCONCELOS, R.R.A. de; BARROS, M.F.C.; SILVA, E.F. e; GRACIANO, E.S.A.; FONTENELE, A.J.P.B. SILVA, N.M.L. da. Características físicas de solos salino-sódicos do semiárido pernambucano em função de diferentes níveis de gesso. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v.17, p.1318-1325, 2013.

VERBRUGGEN, N.; HERMANS, C. Proline accumulation in plants: a review. **Amino Acids**, p.753-759, 2008.

VIOLANTE, M. **Potencial de produção de cana-energia em áreas agrícolas marginais no Brasil**. 2012. 112f. Dissertação de Mestrado (Mestrado em Economia e Agroenergia) - Escola de Economia de São Paulo da Fundação Getúlio Vargas, São Paulo-SP, 2012.

ZHU, J.K. Plant salt tolerance. **Trends Plant Science**, v.6, p.66-71, 2001.

4. ARTIGO 1

DIVERSIDADE GENÉTICA DO COMPLEXO *Saccharum* USANDO MARCADORES ISSR

Genetics and Molecular Research

RESUMO

A cana-de-açúcar (*Saccharum sp.* - Poaceae) é originária do sudeste asiático, e devido à crescente demanda como matéria-prima, seu cultivo expandiu-se para novas fronteiras nos últimos anos. A análise da diversidade genética é fundamental para o direcionamento de estratégias na formação e manutenção de um germoplasma. Este estudo teve como objetivo avaliar a diversidade genética de 26 acessos de cana-de-açúcar do Banco Ativo de Germoplasma da Embrapa Tabuleiros Costeiros, utilizando marcadores moleculares de repetição de sequência inter-simples (ISSR). Dezesesseis primers foram utilizados, resultando em 87 fragmentos com 91,13% de polimorfismo. A similaridade dos indivíduos variou entre 0,22 e 0,87. Os indivíduos mais próximos geneticamente foram RB867515 e RB92579, e os mais distantes foram PI240785 e NSL 291970. Através da UPGMA houve a formação de quatro grupos distintos. Esta informação pode ser utilizada para priorizar a seleção de acessos para a realização de hibridações no melhoramento genético e ações de intercâmbio de germoplasma.

Palavras-chave: *S. officinarum*, *S. robustum*, *S. sinense*, *S. spontaneum*, Marcadores moleculares ISSR.

ABSTRACT

Title: Genetic diversity of *Saccharum* complex using ISSR markers

Sugarcane (*Saccharum* sp, Poaceae) is native to Southeast Asia, and due to growing demand as raw material, its cultivation recently expanded to new frontiers. The genetic diversity analysis is essential for targeting strategies in the formation and maintenance of a germplasm. This study aimed to assess the genetic diversity of 26 accessions of sugarcane from the Active Germplasm Bank of Embrapa Coastal Tablelands, using inter-simple sequence repeat (ISSR) molecular markers. Sixteen primers were used, resulting in 87 fragments with 91.13% of polymorphism. The similarity of the individuals ranged between 0.22 and 0.87. Individuals RB867515 and RB92579 were closer genetically, and the most distant ones were PI240785 and NSL 291970. Four distinct clusters were formed, using UPGMA. This information can be used to prioritize the selection of accessions for the conduction of hybridization in breeding and germplasm exchange actions.

Key-words: *S. officinarum*, *S. robustum*, *S. sinense*, *S. spontaneum*, ISSR molecular markers.

4.1. Introdução

A cana-de-açúcar (*Saccharum* sp.) é uma planta da família Poaceae, de metabolismo fotossintético C₄, originária do sudeste asiático que é cultivada em regiões tropicais e subtropicais (Casu et al., 2004). Seu cultivo expandiu-se para novas fronteiras nos últimos anos devido à crescente demanda como matéria-prima (biomassa) para a produção de etanol e geração de energia, como fonte de vários novos produtos de valor agregado juntamente com a produção de açúcar (Santos et al., 2012).

O gênero *Saccharum* inclui seis espécies: a cana nobre, *S. officinarum* (2n = 80), duas espécies selvagens, *S. robustum* (2n = 60-80) e *S. spontaneum* (2n = 40-128), e três espécies secundárias, *S. barberi* (2n = 81-124), *S. sinense* (2n = 111-120) e *S. edule* (2n = 60, 70, 80). *S. officinarum*, *S. spontaneum* e *S. robustum* representam as espécies básicas, e *S. barberi* e *S. sinense* são as espécies secundárias derivadas, provavelmente da hibridação de *S. officinarum* e *S. spontaneum*. Todas as espécies citadas juntamente com os gêneros *Erianthus*, *Miscanthus*, *Narenga* e *Sclerostachya* constituem o "complexo *Saccharum*" (Daniels et al., 1975).

Como existe uma necessidade de diversificar a base genética das cultivares modernas para atender um mercado cada vez mais competitivo, principalmente pelo fato destas serem derivadas de retrocruzamentos exclusivos envolvendo poucos clones de *S. officinarum* e *S. spontaneum* (Shrivastava e Srivastava, 2016), é de suma importância a caracterização de cultivares em todo o mundo (Almeida et al., 2009).

Como resultado, programas de melhoramento de cana-de-açúcar tem emergido em várias partes do globo. No Brasil, a Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária -EMBRAPA, iniciou estudos sobre cana energia com o intuito de futuramente deixar à disposição do setor sucroenergético e do agronegócio brasileiro, materiais genéticos com níveis mais elevados de biomassa, adaptados a diferentes regiões de cultivo. A Embrapa Tabuleiros Costeiros localizada em Sergipe, região Nordeste, tem conservado em um Banco Ativo de Germoplasma 128 acessos, incluindo os gêneros *Saccharum*, *Erianthus* e *Miscanthus*, provenientes de coleta no Brasil e importações e intercâmbios com instituições internacionais, de onde a caracterização molecular para identificação da diversidade genética tem sido realizada.

A possibilidade de acessar a variabilidade genética diretamente em nível de DNA faz com que sejam disponibilizadas técnicas precisas que auxiliam o processo de proteção intelectual de materiais genéticos. Os marcadores moleculares são ferramentas importantes para o melhoramento genético de plantas e visam o mapeamento de genes, a análise da diversidade genética, os diagnósticos de doenças e os estudos taxonômicos e evolutivos (Wünsch e

Hormaza, 2007). Em cana-de-açúcar, alguns trabalhos têm sido realizados para identificar a diversidade genética entre genótipos com uso de marcadores AFLP (Selvi et al., 2006), RAPD (Khan et al., 2009; Ullah et al., 2013), coSSR (Raj et al., 2016), SSR (Pandey et al., 2011) e ISSR (Srisvatava and Gupta, 2008; Almeida et al., 2009; Devarumath et al., 2012; Rao et al., 2016). Marcadores moleculares RAPD e ISSR têm sido aplicados para a tolerância ao estresse hídrico em variedades de cana-de-açúcar (Fahmy et al., 2008).

O objetivo deste estudo foi avaliar a diversidade genética de acessos de cana-de-açúcar do Banco Ativo de Germoplasma da Embrapa Tabuleiros Costeiros utilizando marcadores moleculares ISSR, visando o uso na seleção de acessos para a realização de hibridações no melhoramento genético da espécie e intercâmbio de germoplasma.

4.2. Material e Métodos

Foram utilizados 24 acessos de cana-de-açúcar estabelecidos *in vitro*, a partir do segundo subcultivo, cedidos pela National Center for Genetic Resources Preservation/ARS/USDA, Fort Collins, CO, EUA, e duas variedades “RB” da Rede Interuniversitária para o Desenvolvimento do Setor Sucroenergético, caracterizadas como variedades muito plantadas no Brasil (Tabela 1). Todos os acessos compõem o Banco Ativo de Germoplasma do Complexo *Saccharum* da Embrapa Tabuleiros Costeiros, localizado no Campo Experimental Jorge Prado Sobral, situado na cidade de Nossa Senhora das Dores, SE, Brasil (10°29'27" S; 37°11'34").

Folhas jovens dos 26 acessos foram coletadas, identificadas, embaladas em sacos plásticos, e armazenadas em -80°C no Laboratório de Biologia Molecular da Embrapa Tabuleiros Costeiros.

Tabela 1: Características dos 26 acessos do “Complexo *Saccharum*” do Banco Ativo de Germoplasma da Embrapa Tabuleiros Costeiros, Brasil.

Número	Identificação do acesso	Espécie
1	Q 45866	<i>Saccharum officinarum</i>
2	Q 46199	<i>Saccharum robustum</i>
3	Q 45251	<i>Saccharum robustum</i>
4	Q 42509	<i>Saccharum</i> spp.
5	Q 45911	<i>Saccharum officinarum</i>
6	Q 45864	<i>Saccharum officinarum</i>
7	Q 44830	<i>Saccharum officinarum</i>
8	Q 45337	<i>Saccharum</i> hybrid
9	Q 45416	<i>Saccharum</i> spp.
10	Q 44890	<i>Saccharum officinarum</i>
11	Q 44833	<i>Saccharum officinarum</i>
12	Q 45869	<i>Saccharum officinarum</i>
13	Q 42433	<i>Saccharum</i> hybrid
14	PI 240785 Q 45923 NG 57-208	<i>Saccharum robustum</i>
15	PI 197800 Sumatra #2	<i>Saccharum spontaneum</i>
16	Q 36830 MOL 6091	<i>Saccharum</i> sp.
17	GH-49 UNKR65P35	<i>Saccharum robustum</i>
18	MIA 35303 MOL 6091	<i>Saccharum robustum</i>
19	NSL 291970 Glagh 1286	<i>Saccharum spontaneum</i>
20	PI 88652 NG 28213	<i>Saccharum officinarum</i>
21	MIA 35301 MOL 6089	<i>Saccharum robustum</i>
22	RB 867515	<i>Saccharum</i> sp.
23	RB 92579	<i>Saccharum</i> sp.
24	PI 495109 Q46207 IN 84-045	<i>Saccharum robustum</i>
25	PI 286657 SES-006	<i>Saccharum spontaneum</i>
26	PI 29109	<i>Saccharum sinense</i>

A extração de DNA seguiu o protocolo de Romano e Brasileiro (1999). Foram utilizados 16 primers ISSR (University of British Columbia, Vancouver, Canadá) para detectar polimorfismos a uma concentração de 15 ng/mL. Os primers foram selecionados aleatoriamente. As amplificações de PCR foram realizadas em termociclador (Veriti, Applied Biosystems) onde as amostras foram inicialmente sujeitas a desnaturação a 94 °C durante 4 min, seguidas de 37 ciclos de amplificação. Durante cada ciclo, as amostras foram submetidas a desnaturação a 94 °C durante 1 min, anelamento a diferentes temperaturas durante 2 minutos e extensão a 72 °C durante 2 min.

Cada reação ISSR foi realizada em um volume final de 20 µL contendo 1,5 µL de 15 ng/mL de DNA; 0,2 µL de DNA polimerase Taq (Invitrogen); 0,6 µL de MgCl₂; 0,4 µL dNTP; 1 µL de iniciador (oligonucleótidos); 2 µL de tampão; e 14,3 µL de água ultrapura.

Os fragmentos foram visualizados em 2% de gel de agarose [1X TBE; Tris 89 mM; ácido bórico 89 mM; EDTA 2,5 mM; pH 8,3] em um sistema de eletroforese horizontal executado a uma tensão constante de 182 V, 91 mA e 17 W durante 115 min. Para a padronização do tamanho das bandas, utilizou-se 5 µL de marcador de peso molecular de 100 pb. Os géis foram corados com solução de brometo de etídio (0,02 mL/mL de água), durante

aproximadamente 30 min, e depois visualizados sob luz UV, usando o dispositivo de fotodocumentação Loccus L-pix HE (Loccus Biotecnologia, Brasil).

A análise de gel resultou em uma matriz binária de acordo com a presença (1) ou ausência (0) de bandas fluorescentes. A partir do número de bandas amplificadas, calculou-se a porcentagem de loci polimórficos. Os coeficientes de similaridade foram calculados utilizando o índice Jaccard (Jaccard, 1908).

Para determinar o número mínimo de fragmentos amplificados necessários para estudos de diversidade genética, foram obtidas as estimativas de correlação (r) de valores da matriz de similaridade e o valor de estresse (E), que indica o ajuste entre a matriz original e a matriz simulada. O número ótimo de fragmentos foi calculado por meio do software GENES (Cruz, 2007) e considerado satisfatório para as análises quando o valor do estresse foi inferior a 0,05 (Kruskal, 1964) e a correlação mais próxima de 1.

A partir da matriz de similaridade, um dendrograma foi gerado pelo método de grupo de pares não ponderado com média aritmética (UPGMA). O Bootstrapping foi realizado com 10 000 repetições utilizando o software FreeTree (Pavlícek et al., 1999). O software TreeView também foi usado para gerar o dendrograma (Pavlícek et al., 1999). As amostras foram agrupadas considerando a análise de coordenadas principais (PCoA), com a ajuda do software Genalex v.p (Peakall e Smouse, 2006). O índice Shannon (H') (Brown e Weir, 1983) e a heterozigosidade esperada (H_e) (Lynch e Milligan, 1994) também foram estimados usando o software Genalex 6.3 (Peakall e Smouse, 2006).

4.3. Resultados e Discussão

Os indivíduos foram analisados com base em 87 loci obtidos de 16 primers ISSR. O número ótimo para obter precisão desejada nas análises de diversidade genética com a espécie em estudo foi a partir de 83 fragmentos, quando o estresse assumiu valor de 0,055 e a correlação (r) de 0,991 (Figura 1).

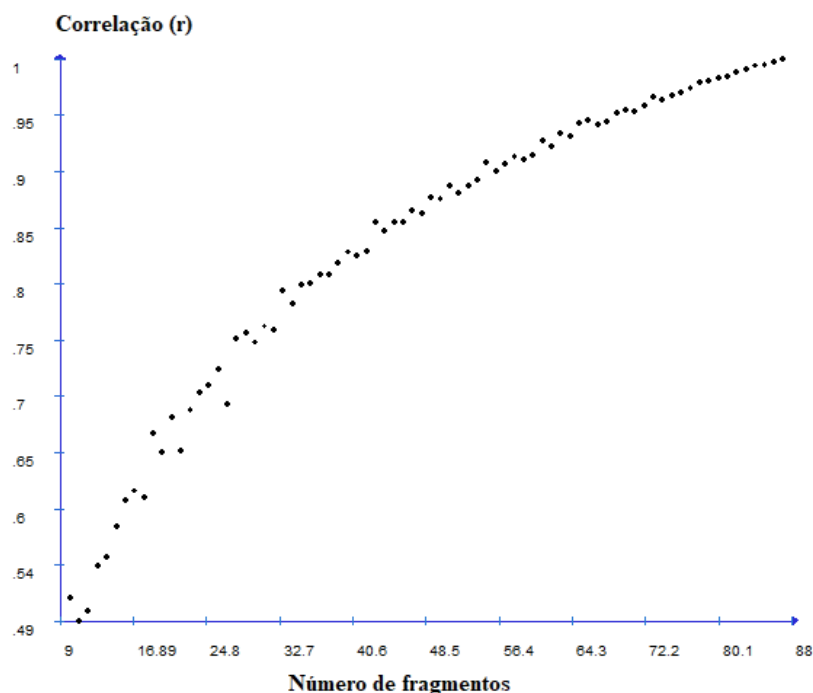


Figura 1: Coeficiente de correlação e número de fragmentos, usando marcadores ISSR, entre 26 indivíduos de cana-de-açúcar provenientes da Embrapa Tabuleiros Costeiros, baseados na similaridade genética obtida pelo método bootstrap.

No presente estudo houve uma relação diretamente proporcional entre o número de fragmentos amplificados e a magnitude de correlação dos valores da matriz de similaridade original obtida a partir de reamostragem com diferentes números de fragmentos amplificados. Assim, a partir do número ótimo de fragmentos obtidos (83), o valor do coeficiente de correlação foi se aproximando do valor máximo, o que comprova a consistência dos dados com o número de primers utilizados e o número de fragmentos obtidos, sendo suficientes para as análises de diversidade genética.

Entre os 16 primers testados na amplificação das amostras, foram gerados 87 loci, dos quais 80 foram polimórficos (91,13%). Em cada reação ISSR, o número total de fragmentos amplificados variou de três (UBC-828, UBC-845, UBC-855) a 12 (UBC-815) (Tabela 2 e Figura 2).

Tabela 2: Iniciadores de repetição de sequência simples (ISSR) usados em 26 acessos de cana-de-açúcar do Banco Ativo de Germoplasma da Embrapa Tabuleiros Costeiros, Brasil, com suas respectivas sequências, temperatura de anelamento (AT), número de bandas fragmentadas (NFB), porcentagem de polimorfismo (P%), índice de Shannon (I) e heterozigosidade esperada (He).

Primers	Sequencia (5'-3')	AT (°C)	NFB	%P	I	He
807	AGA GAG AGA GAG AGA GT	47	4	100	0,53	0,36
812	GAG AGA GAG AGA GAG AA	54,8	7	100	0,48	0,31
815	CTC TTC TCT CTC TCT CTG	47,6	12	100	0,49	0,32
816	CAC ACA CAC ACA CAC AT	54,8	5	100	0,37	0,22
818	CAC ACA CAC ACA CAC AG	57,2	4	100	0,44	0,28
825	ACA CAC ACA CAC ACA CT	54,8	7	85,7	0,43	0,29
826	ACA CAC ACA CAC ACA CC	57,2	5	100	0,48	0,31
827	ACA CAC ACA CAC ACA CG	57,2	5	100	0,60	0,41
828	TGT GTG TGT GTG TGT GA	54,8	3	100	0,24	0,14
835	AGA GAG AGA GAG AGA GYC	58,8	7	100	0,56	0,38
841	GAG AGA GAG AGA GAG AYC	48,5	5	20	0,12	0,08
845	CTC TCT CTC TCT CTC TRG	48,1	3	66,7	0,38	0,26
851	GTG TGT GTG TGT GTG TYG	49,2	4	100	0,67	0,48
855	ACA CAC ACA CAC ACY T	53,1	3	100	0,60	0,41
856	ACA CAC ACA CAC ACA CYA	56,4	7	85,7	0,43	0,28
887	DVD TCT CTC TCT CTC CT	55,6	6	100	0,42	0,27
Média total			5,44	91,13	0,45	0,30

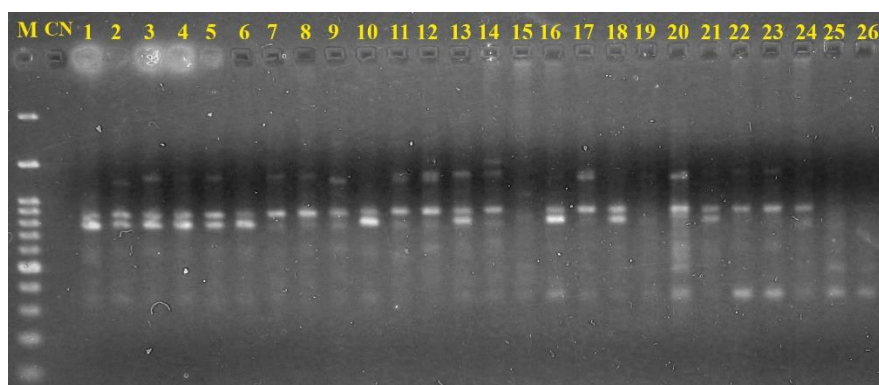


Figura 2. Perfis eletroforéticos ISSR de 26 acessos de cana-de-açúcar amplificados em gel de agarose usando o primer UBC 887. Embrapa Tabuleiros Costeiros, Brasil. M: marcador 100 pb; CN: controle negativo; 1 a 26: amostras de DNA.

Diversos marcadores têm sido utilizados para estudos de diversidade em cana-de-açúcar. O AFLP, que apresenta vantagens como a detecção de maior número de loci, foi utilizado por Selvi et al. (2006), em espécies do gênero *Saccharum* e obtiveram 1323 bandas com 12 pares de primers, dos quais 1122 (84,8%) eram polimórficas. Ullah et al. (2013) utilizaram oito marcadores RAPD e observaram 73,5 % de polimorfismo entre as 5 variedades estudadas. Em estudo realizado com 20 acessos de *Saccharum officinarum* no Paquistão, Khan et al. (2009) demonstraram 86,8% de polimorfismo por 188 dos 210 fragmentos polimórficos obtidos pela utilização de 21 primers RAPD. Raj et al. (2016), analisando a diversidade genética do complexo *Saccharum* usando marcadores microssatélites de cloroplasto (coSSR), encontraram amplificações polimórficas (100%) em nove primers amplificando 54 fragmentos. Já Pandey et al. (2011) encontraram 148 bandas polimórficas em cinco primers SSR.

Almeida et al. (2009) encontraram alto polimorfismo (95%) utilizando sete primers ISSR, onde dos 56 fragmentos obtidos, 53 foram polimórficos. Srivastava e Gupta (2008) ao analisar a diversidade de 40 genótipos de cana-de-açúcar, encontraram 79 bandas amplificadas por dez primers ISSR, das quais 62 (78,48%) eram polimórficas e 17 eram monomórficas. Devarumath et al. (2012) encontraram em 13 primers ISSR, utilizados para a amplificação de PCR, a produção de 65 fragmentos amplificados, com 96,5% de polimorfismo. Rao et al. (2016), para a análise ISSR, utilizaram 19 primers em 14 genótipos de cana-de-açúcar para amplificação da reação em cadeia da polimerase (PCR), um total de 164 bandas foram marcadas com 109 bandas polimórficas e 55 bandas monomórficas.

Estes resultados, assim como os do presente estudo, comprovam a eficiência de marcadores ISSR quando comparados com outros marcadores, revelando um alto grau de polimorfismo.

O índice de Shannon (I) variou de 0,12 a 0,67, com uma média de 0,45. A heterozigosidade esperada (He) variou de 0,08 a 0,48, com média de 0,30 (Tabela 2). Esses índices revelaram níveis intermediários de diversidade genética. No entanto, para alguns iniciadores, como 827, 851 e 855, os valores de I e He podem ser considerados altos, mostrando alta variabilidade. De acordo com Giustina et al. (2014), o valor de I pode variar entre 0 e 1, com um valor de 1 indicando a máxima diversidade de uma população. Os valores encontrados neste estudo estão próximos daqueles verificados por Nayak et al. (2014) em *S. spontaneum*, *S. officinarum*, *S. hybrid*, *S. barberi*, *S. robustum*, and *S. sinense*, em que os valores de I encontrados foram entre 0,38 e 0,49 e de H foram entre 0,23 e 0,30.

O conteúdo de informação polimórfico (PIC) indica quanto o marcador usado mostra de informação polimórfica em estudos de diversidade genética. Valores maiores que 0,5 são muito informativos; aqueles entre 0,25 e 0,50 são moderadamente informativos; e valores inferiores a 0,25 são considerados não-informativos (Botstein et al., 1980). No presente estudo, o valor de PIC foi 0,28, considerado moderadamente informativo.

O coeficiente de similaridade de Jaccard variou entre 0,22 e 0,87, com média de 0,49, o que indica uma diversidade genética relativamente alta. Os acessos RB867515 e RB92579, ambos *Saccharum* sp, foram as mais semelhantes geneticamente, com índice 0,87. Por outro lado, o par de acessos PI240785 e NSL 291970, *S. robustum* e *S. spontaneum*, respectivamente, mostrou a menor similaridade genética (0,22).

O polimorfismo identificado pelos marcadores foi utilizado para construir uma matriz de distância genética. Com base no coeficiente de Jaccard foram identificados quatro grupos principais na análise UPGMA (Figura 3). O indivíduo mais distante, PI240785, está no cluster C1. A maioria dos acessos (todos provenientes de Queensland-Austrália) foi alocada em um cluster principal C2, com vários sub-clusters, sendo Q45866 e Q46199 os mais próximos (0,77) desse grupo.

O segundo cluster principal, C3, possui 8 indivíduos separados em subclusters, com os indivíduos RB867515 e RB92579 possuindo maior similaridade (0,87). Já o cluster C4 apresentou-se isolado dos demais e contendo todos os acessos de *Saccharum spontaneum* e

Saccharum sinensis, separados em dois sub-clusters com similaridade de 0,73 entre os acessos PI286657 e PI29109.

Apesar da grande distribuição de acessos na maioria dos grupos, indicando grande diversidade genética, estes não foram separados por um grupo da mesma espécie em cada sub-cluster, o que pode ser explicado pela existência de alelos comuns entre as diferentes espécies, já que se tratam do mesmo gênero. Resultados similares foram encontrados por Raj et al. (2016), onde houve uma relação mais estreita entre as diferentes espécies que constituem o complexo *Saccharum*, entretanto com *S. spontaneum* contribuindo para a maior diversidade. Segundo os autores, *S. spontaneum* é conhecida por ser uma espécie altamente variável no que diz respeito à morfologia, distribuição geográfica e número de cromossomo ($2n = 48 - 128$). Alta divergência de *S. spontaneum* com o resto da espécie *Saccharum* também foi relatado por Alwala et al. (2006).

Já Selvi et al. (2006) encontraram resultados contrários, em que o gênero *Saccharum* foi organizado em um grande cluster, no entanto, com cada grupo de espécies em sub-clusters separados.

Tabela 3: Matriz gerada baseada no coeficiente de similaridade de Jaccard em 26 acessos de cana-de-açúcar do Banco Ativo de Germoplasma da Embrapa Tabuleiros Costeiros, Brasil.

	Q45866	Q46199	Q45251	Q42509	Q45911	Q45864	Q44830	Q45337	Q45416	Q44890	Q44833	Q45869	Q42433	PI240785	PI197800	Q36830	GH-49	MIA35303	NSL29197	PI88652	MIA35301	RB867515	RB92579	PI495109	PI286657	PI29109
Q45866	-																									
Q46199	0,77	-																								
Q45251	0,57	0,58	-																							
Q42509	0,64	0,70	0,52	-																						
Q45911	0,46	0,52	0,47	0,60	-																					
Q45864	0,74	0,71	0,52	0,58	0,54	-																				
Q44830	0,60	0,63	0,55	0,61	0,54	0,66	-																			
Q45337	0,60	0,61	0,48	0,46	0,40	0,58	0,63	-																		
Q45416	0,59	0,52	0,56	0,51	0,46	0,56	0,51	0,59	-																	
Q44890	0,61	0,61	0,58	0,62	0,54	0,64	0,65	0,53	0,54	-																
Q44833	0,56	0,57	0,63	0,54	0,49	0,57	0,63	0,52	0,55	0,67	-															
Q45869	0,57	0,60	0,54	0,53	0,48	0,60	0,52	0,60	0,59	0,50	0,54	-														
Q42433	0,45	0,51	0,52	0,53	0,48	0,48	0,50	0,48	0,40	0,60	0,54	0,53	-													
PI240785	0,41	0,44	0,34	0,43	0,40	0,47	0,45	0,54	0,46	0,48	0,43	0,41	0,42	-												
PI197800	0,45	0,48	0,39	0,45	0,35	0,44	0,40	0,46	0,39	0,31	0,33	0,43	0,34	0,33	-											
Q36830	0,44	0,54	0,47	0,53	0,44	0,45	0,46	0,52	0,38	0,46	0,39	0,42	0,43	0,41	0,53	-										
GH-49	0,46	0,57	0,42	0,45	0,43	0,54	0,54	0,57	0,39	0,51	0,46	0,48	0,42	0,38	0,40	0,47	-									
MIA35303	0,49	0,53	0,45	0,49	0,47	0,45	0,44	0,53	0,44	0,52	0,41	0,41	0,43	0,44	0,41	0,50	0,57	-								
NSL29197	0,34	0,38	0,34	0,38	0,35	0,33	0,31	0,31	0,32	0,32	0,33	0,36	0,31	0,22	0,62	0,42	0,41	0,48	-							
PI88652	0,41	0,50	0,48	0,46	0,33	0,40	0,44	0,43	0,42	0,46	0,47	0,39	0,40	0,35	0,38	0,42	0,47	0,55	0,48	-						
MIA35301	0,50	0,56	0,49	0,53	0,45	0,48	0,47	0,48	0,40	0,60	0,48	0,37	0,40	0,42	0,36	0,51	0,54	0,68	0,49	0,56	-					
RB867515	0,52	0,59	0,48	0,57	0,53	0,55	0,52	0,55	0,55	0,57	0,53	0,56	0,49	0,45	0,47	0,52	0,53	0,57	0,45	0,60	0,52	-				
RB92579	0,52	0,59	0,51	0,57	0,50	0,54	0,52	0,57	0,55	0,52	0,48	0,56	0,47	0,45	0,49	0,55	0,50	0,54	0,46	0,54	0,49	0,87	-			
PI495109	0,48	0,53	0,44	0,50	0,45	0,53	0,53	0,58	0,39	0,53	0,51	0,52	0,50	0,45	0,45	0,53	0,54	0,52	0,41	0,46	0,50	0,62	0,62	-		
PI286657	0,27	0,35	0,27	0,34	0,31	0,29	0,31	0,37	0,27	0,27	0,28	0,27	0,23	0,25	0,39	0,41	0,40	0,43	0,49	0,46	0,47	0,39	0,42	0,37	-	
PI29109	0,34	0,46	0,32	0,40	0,35	0,36	0,36	0,40	0,32	0,35	0,33	0,32	0,29	0,26	0,45	0,51	0,45	0,49	0,46	0,52	0,44	0,52	0,49	0,47	0,73	-

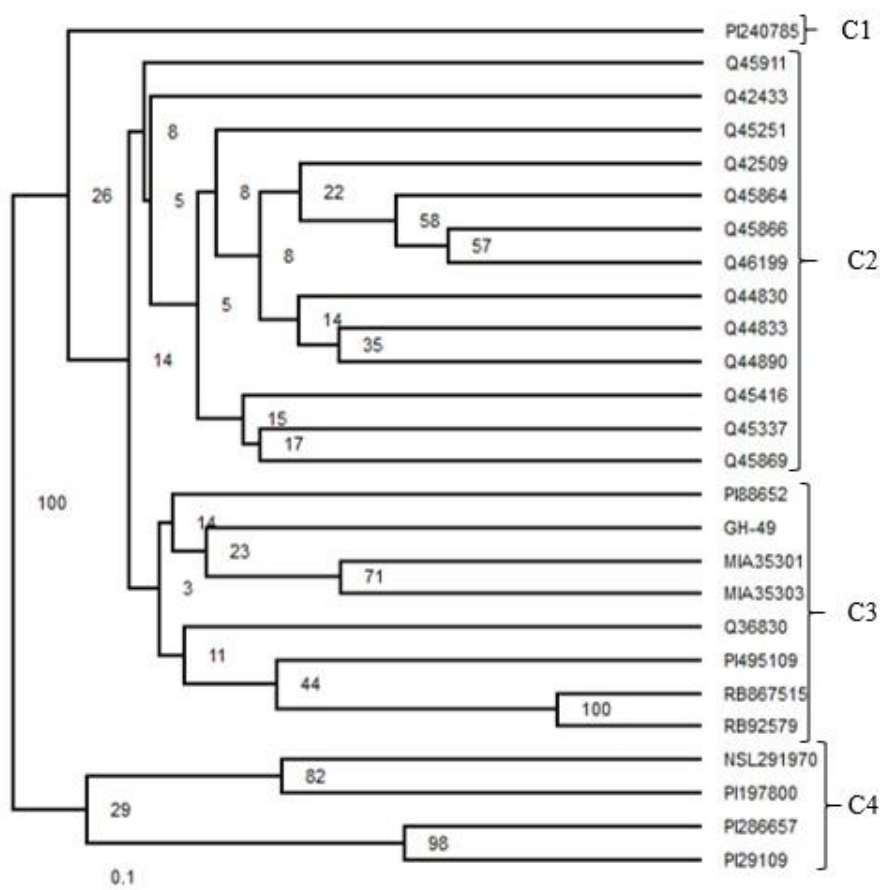


Figura 3: Representação filogenética do Método do Grupo de Pares Não Ponderados utilizando o agrupamento de médias aritméticas (UPGMA) estimado pela similaridade genética do coeficiente de Jaccard e pela análise de bootstrap (10 000x) para 26 acessos de cana-de-açúcar do Banco Ativo de Germoplasma da Embrapa Tabuleiros Costeiros, Brasil.

As distâncias genéticas também foram avaliadas pela PCoA (Figura 4). Foram identificados quatro agrupamentos entre os diferentes acessos estudados e a soma dos dois primeiros componentes principais foi de 49,30%. Estes resultados reforçam a eficiência dos marcadores ISSR na detecção de diversidade genética entre os acessos de cana-de-açúcar. De acordo com os resultados da UPGMA, alguns pares de indivíduos (RB867515/RB92579, PI286657/PI29109, Q45866/Q46199, Q44833/Q44890, Q45337/Q45869) estavam geneticamente muito próximos na PCoA, mostrando que a utilização de mais de um método de agrupamento evita que interferências errôneas sejam adotadas na alocação de materiais dentro de um subgrupo genotípico específico (Silva et al., 2011).

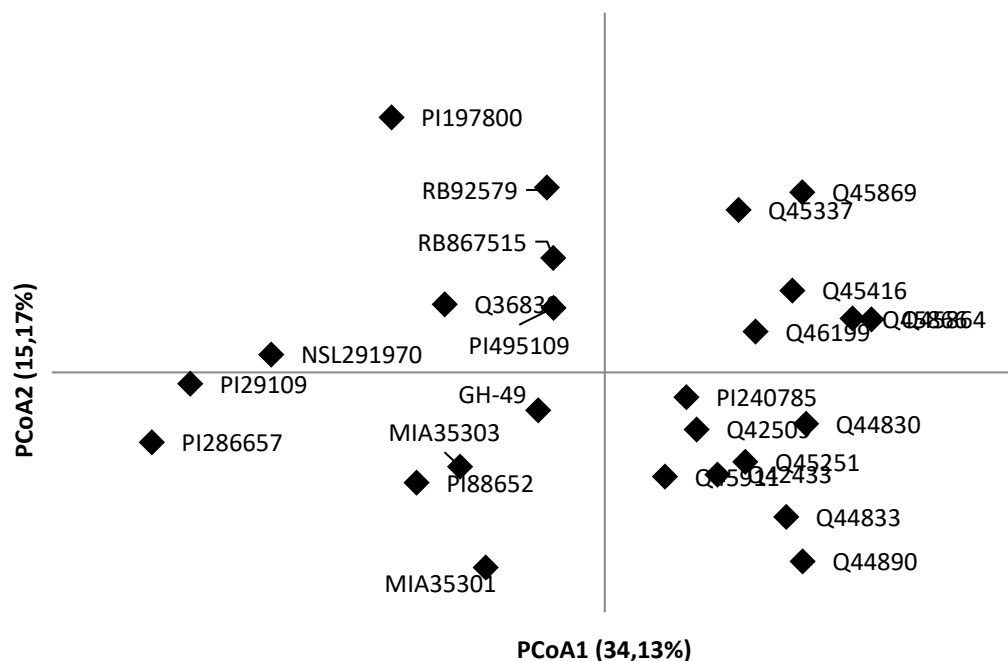


Figura 4: Análise de coordenadas principais (PCoA) de 26 acessos de cana-de-açúcar do Banco Ativo de Germoplasma da Embrapa Tabuleiros Costeiros, Brasil.

4.4. Conclusões

A diversidade genética dos acessos de cana-de-açúcar do Banco Ativo de Germoplasma da Embrapa Tabuleiros Costeiros é considerada alta. O par de indivíduos com menor similaridade genética foi PI240785 e NSL 291970, *S. robustum* e *S. spontaneum*, respectivamente.

Os resultados encontrados nesse estudo mostram que o nível de resolução genética e confiabilidade obtida por meio da análise com marcadores moleculares ISSR possibilitou a discriminação de acessos diferentes geneticamente, que poderão ser utilizados para o manejo dos recursos genéticos da espécie e, uma vez selecionados, serão importantes para programas de melhoramento que visam à seleção de genótipos superiores.

4.5. Referências Bibliográficas

- Almeida CMA, Lima SEN, Lima GSA, Brito JZ, et al. (2009). Caracterização molecular de cultivares de cana-de-açúcar utilizando marcadores ISSR. *Ciênc. Agrotec.* 33: 1771-1776.
- Alwala S, Suman A, Arro JA, Veremis JC and Kimbeng CA. (2006). Target region amplification polymorphism (TRAP) for accessing genetic diversity in sugarcane germplasm collections. *Crop Science.* 46: 448–455.
- Botstein D, White RL, Skolnick M and Davis RW (1980). Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. *Am. J. Hum. Genet.* 32: 314-331.
- Brown AHD and Weir BS (1983). Measuring genetic variability in plant populations. In: *Isozymes in Plant Genetics and Breeding, Part A* (Tanksley SD and Orton TJ, ed.). *Elsevier Science*, Amsterdam, 219-239.

- Casu RE, Dimmock CM, Chapman SC, Grof CPL, et al. (2004). Identification of differentially expressed transcripts from maturing stem of sugarcane by in silico analysis of stem expressed sequence tags and gene expression profiling. *Plant Mol. Biol.* 54:503-517.
- Cruz CD. Genes: Aplicativo computacional em genética e estatística. Viçosa, MG: UFV, 2007.
- Daniels J, Smith P, Panton N. and Williams CA (1975). The origin of the genus *Saccharum*. *Sugarcane Breed. Newsl.* 36: 24–39.
- Devarumath BM, Kalwade SB, Kavar PG, Sushir KV (2012). Assesment of genetic diversity in sugarcane germoplasm using ISSR and SSR markers. *Sugar Tech.* 14(4): 334-344.
- Fahmy EM, El-Gawad NMA, El-Geddawy IH, Saleh OM, El-Azab NM (2008). Development of RAPD and ISSR markers for drought tolerance in sugarcane (*Saccharum officinarum* L.). *Egypt. J. Genet. Cytol.* 37(1): 1-15.
- Giustina LD, Luz LN, Vieira FS, Rossi FS, Soares-Lopes CR, Pereira TN, Rossi AA (2014). Population structure and genetic diversity in natural populations os *Theobroma speciosum* Willd. Ex Spreng (Malvaceae). *Genet Mol Res.* 13: 47-53.
- Jaccard P (1908). Nouvelles recherches sur la distribution florale. *Bull. Soc. Vaud. Sci. Nat.* 44: 223-270.
- Khan FA, Khan A, Azhar FM, Raul S (2009). Genetic diversity of *Saccharum officinarum* accessions in Pakistan as revealed by random amplified polymorphic DNA. *Genet Mol Res.* 8 (4): 1376-1382.
- Kruskal JB (1964). Multidimensional scaling by optimizing goodness of fit to a nonmetric hypothesis. *Psychometrika.* 29(1):1-27.
- Lynch M and Milligan BG (1994). Analysis of population genetic structure with RAPD markers. *Mol. Ecol.* 3: 91-99. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-294X.1994.tb00109.x>
- Nayak SN, Song J, Villa A, Pathak B, Ayala-Silva T, et al. (2014) Promoting Utilization of *Saccharum* spp. Genetic Resources through Genetic Diversity Analysis and Core Collection Construction. *PLoS ONE.* 9(10): e110856. doi:10.1371/journal.pone.0110856
- Pandey A, Mishra RK, Mishra S, Singh YP, Pathak S (2011). Assessment of Genetic Diversity among Sugarcane Cultivars (*Saccharum officinarum* L.) using Simple Sequence Repeats Markers. *Online J Biol Sci.* 11(4): 105-111.
- Pavlíček A, Hrdá S and Flegr J (1999). Free-Tree--freeware program for construction of phylogenetic trees on the basis of distance data and bootstrap/jackknife analysis of the tree robustness. Application in the RAPD analysis of genus *Frenkelia*. *Folia Biol. (Praha)* 45: 97-99.
- Peakall R and Smouse PE (2006). Genalex 6: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. *Mol. Ecol. Resour.* 6: 288-295. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1471-8286.2005.01155.x>
- Rao VP, Singh S, Chaudhary R, Sharma MK, Sengar RS, Singh UM, Sharma V (2016). Genetic variability in sugarcane (*Saccharum* spp. Hybrid) genotypes through inter simple sequence repeats (ISSR) markers. *J. Appl. Nat. Sci.* 8(3): 1404-1409.

- Raj P, Selvi A, Prathima PT, Nair NV (2016). Analysis of Genetic Diversity of *Saccharum* Complex Using Chloroplast Microsatellite Markers. *Sugar Tech.* 18(2):141-148.
- Romano E and Brasileiro ACM (1999). Extração de DNA de plantas. *Biot. Ciênc. Desenvolv.* 9: 40-43.
- Santos JM, Duarte Filho LSC, Soriano ML, Silva PP, Nascimento VX, Barbosa GVS, Todaro AR (2012). Genetic diversity of the main progenitors of sugarcane from the RIDESA germplasm bank using SSR markers. *Ind. Crops Prod.* 40(1): 145–150.
- Selvi A, Nair NV, Noyer JL, Singh NK, Balasundaram N, Bansal KC, Koundal, KR, Mohapatra T (2006). AFLP analysis of the phenetic organization and genetic diversity in the sugarcane complex, *Saccharum* and *Erianthus*. *Genet Res Crop Evol.* 53: 831-842.
- Shrivastava AK, Srivastava S (2016). Diversity of the germplasm of *Saccharum* species and related genera available for use in directed breeding programmes for sugarcane improvement. *Current Sci.* 111:475-482.
- Silva AVC, Santos ARF, Wickert E, Silva JFS, et al. (2011). Diversidade genética entre acessos de mangabeira (*Hancornia speciosa* Gomes). *Rev. Bras. Cienc. Agr.* 6: 572-578.
- Srivastava S, Gupta OS (2008). Inter simple sequence repeat profile as a genetic marker system in sugarcane. *Sugar Tech.* 10(1): 48-52.
- Ullah SMS, Hossain MA, Hossain MM, Barman S, Sohag MMH, Prodhan SH (2013). Genetic diversity analysis of chewing sugarcane (*Saccharum officinarum* L.) varieties by using RAPD markers. *J BioSci Biotech.* 2(2): 145-150.
- Wünsch A, Hormaza JI (2007). Characterization of variability and genetic similarity of European pear using microsatellite loci developed in apple. *Sci Hort.* 113:37-43.

5. ARTIGO 2

EFEITOS DO ESTRESSE HÍDRICO *IN VITRO* NO CRESCIMENTO, ACÚMULO DE PROLINA E DEFESA ANTIOXIDANTE EM CANA-DE-AÇÚCAR

Journal of Agricultural Science

RESUMO

O estresse hídrico é o fator ambiental mais limitante à produtividade das culturas e apresenta uma grande variabilidade no seu grau de tolerância entre e dentro de espécies, e entre variedades. O objetivo deste estudo foi caracterizar acessos de cana-de-açúcar quanto à tolerância ao estresse hídrico durante cultivo *in vitro*, a partir de mudanças nos caracteres biométricos, fisiológicos e bioquímicos, dentro e entre espécies, para auxiliar futuros programas de melhoramento. Foram utilizadas brotações adventícias de cinco acessos de cana-de-açúcar das espécies *Saccharum robustum*, *Saccharum spontaneum* e *Saccharum officinarum*, cultivadas em meio Murashige e Skoog, suplementado com 2% de sacarose e 4 g/L de Phytigel, em cinco potenciais hídricos, 0, -0.3, -0.6, -0.9, -1.2 MPa, induzidos por manitol. Sobrevivência, comprimento das brotações e raízes, número de brotações e raízes, biomassa, teor de prolina nas folhas e atividade de enzimas antioxidantes foram analisados. Existe diferença entre as espécies, e ainda, dentro da mesma espécie de cana-de-açúcar quando submetidas ao estresse hídrico *in vitro*, sendo que *S. officinarum* demonstrou ser mais tolerante. A prolina pode ser utilizada como um indicador bioquímico de resposta ao estresse hídrico em acessos de cana-de-açúcar e seu acúmulo foi intensificado nos acessos de *S. robustum* e *S. spontaneum*. A atividade de CAT permaneceu inalterada com o aumento do estresse nos acessos avaliados.

Palavras-chave: ajuste osmótico, enzimas antioxidantes, *Saccharum robustum*, *Saccharum spontaneum*, *Saccharum officinarum*.

ABSTRACT

Effects of *in vitro* Drought Stress on Growth, Proline Accumulation and Antioxidant Defense in Sugarcane

Drought is the most limiting environmental factor to crop productivity and presents a great variability in the degree of tolerance among and within species, among varieties. The aim of this study was to characterize sugarcane accessions regarding tolerance to water stress during *in vitro* cultivation based on changes in biometric, physiological and biochemical characteristics, within species and among species, to support future breeding programs. Adventitious shoots of five sugarcane accessions: *Saccharum robustum*, *Saccharum spontaneum* and *Saccharum officinarum* species, cultivated in Murashige and Skoog medium supplemented with 2% sucrose and 4 g/l Phytigel were used in five water potentials, 0, -0.3, -0.6, -0.9, -1.2 MPa, induced by mannitol. Survival, length of shoots and roots, number of shoots and roots, biomass, proline content in leaves and activity of antioxidant enzymes were analyzed. There is difference among species, and also, within the same sugarcane species when submitted to *in vitro* drought stress, and *S. officinarum* was shown to be the most tolerant. Proline can be used as a biochemical indicator of response to drought in sugarcane accessions and its accumulation was intensified in *S. robustum* and *S. spontaneum* accessions. Catalase activity remained unchanged with increased drought in sugarcane accessions evaluated.

Keywords: antioxidant enzymes, osmotic adjustment, *Saccharum officinarum*, *Saccharum robustum*, *Saccharum spontaneum*.

5.1. Introdução

O estresse hídrico é um dos fatores ambientais que causa maiores danos nos processos fisiológicos e metabólicos das plantas (Taiz e Zeiger, 2009), e um dos mais estudados em razão de seu forte impacto sobre a produtividade das culturas (Filippou et al., 2014). Existe uma grande variabilidade no seu grau de tolerância entre as espécies, e mesmo dentro de uma espécie, entre variedades. Esta diferença é observada por meio do valor do potencial hídrico ideal para as plantas e ao estágio de desenvolvimento em que ocorre o estresse (Inmam-Bamber and Smith, 2005; Pimentel, 2004). Em cana-de-açúcar, dentre quatro estágios distintos de crescimento, o de perfilhamento e de rápido crescimento, têm sido identificados como crítico por demanda de água (Ramesh, 2000), causando severos prejuízos à produção. Nesses estágios são produzidos 70-80% de toda a biomassa acumulada durante o ciclo da cultura (Oliveira et al., 2010).

A tolerância à seca é um mecanismo que permite à planta manter o metabolismo, mesmo com a redução do potencial hídrico dos tecidos (Taiz e Zeiger, 2009), devido principalmente ao acúmulo de solutos compatíveis e à capacidade antioxidante (Verslues et al., 2006). O ajustamento osmótico é considerado um mecanismo ativo de acúmulo de solutos nas células com redução do potencial hídrico celular sem decréscimo na turgidez ou no volume celular e, consequentemente, a manutenção da pressão de turgor que proporciona a manutenção de processos vitais da planta (Taiz e Zeiger, 2009; Basu et al., 2016). Quando acumulados durante o déficit hídrico, os solutos agem na manutenção do balanço da água na célula, na proteção de enzimas e de membranas, são fontes de nitrogênio e carbono após a reidratação (Ashraf e Foolad, 2007; Mccree et al., 1984; Yordanov et al., 2003). Além disso, as plantas ainda ativam mecanismos de proteção enzimática, que incluem enzimas antioxidantes, como superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), e peroxidases como o ascorbato peroxidase (APX) (Mittler, 2002) que são responsáveis pela eliminação de espécies reativas de oxigênio (EROS), cuja

produção é reforçada pelo estresse, e que caracterizam um estresse secundário, o estresse oxidativo (Azevedo Neto et al., 2006; Tuteja, 2007).

No intuito de investigar mudanças bioquímicas e fisiológicas no cultivo de plantas sob estresse hídrico, vários autores utilizam com sucesso a técnica de cultura de tecidos de plantas. Muitas espécies já foram alvo de estudos como cactus (Balén et al., 2013), trigo (Kacem et al., 2017), batata (Albiski et al., 2012), agave (Puentes-Garza et al., 2017), arroz (Verma et al., 2013; Wani et al., 2010), banana (Said et al., 2015) e cana-de-açúcar (Errabi et al., 2007; Patade et al., 2014; 2012; 2008). Diante disto, o objetivo deste estudo foi caracterizar acessos de cana-de-açúcar quanto à tolerância ao estresse hídrico durante cultivo *in vitro*, a partir de mudanças nos caracteres biométricos, fisiológicos e bioquímicos, dentro e entre espécies, para auxiliar futuros programas de melhoramento.

5.2. Material e Métodos

Os experimentos foram conduzidos no Laboratório de Cultura de Tecidos de Plantas e Laboratório de Ecofisiologia da Embrapa Tabuleiros Costeiros, em Aracaju, Sergipe, Brasil.

5.2.1. Material vegetal

Como material vegetal, brotações adventícias foram usadas de: Q45923-*Saccharum robustum*; GH49-*Saccharum robustum*; MIA35301-*Saccharum robustum*; NSL291970-*Saccharum spontaneum*; PI88652-*Saccharum officinarum*, previamente estabelecidos *in vitro*. Os acessos foram provenientes do National Center for Genetic Resources Preservation/ARS/USDA, Fort Collins, CO, USA, que fazem parte do Banco Ativo de Germoplasma de cana-de-açúcar da Embrapa Tabuleiros Costeiros, Aracaju, Sergipe, Brasil.

5.2.2. Condições de crescimento e tratamento de estresse

A cada 30 dias, as culturas foram multiplicadas em ambiente asséptico, em tubos de ensaio contendo 20 ml do meio de multiplicação (MM) constituído por sais do meio MS (Murashige & Skoog, 1962), suplementado com 2% de sacarose, 0,2 mg/l de BAP (6-benzilaminopurina-Sigma-Aldrich) + 0,1 mg/l de cinetina (Sigma-Aldrich), gelificado com 3,5 g/l de Phytigel® (Sigma-Aldrich) e pH ajustado para 5,8.

O meio foi autoclavado a 121°C durante 20 minutos, em todas as etapas. As culturas foram mantidas sob condições de $(25 \pm 2^\circ\text{C})$ temperatura ambiente, fotoperíodo de 12 horas de luz e intensidade luminosa de $60 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$.

Após três subcultivos, brotos com aproximadamente 3 cm de comprimento foram transferidos para tubos de ensaio com 20 ml de meio de cultura constituído pelos sais da MS, suplementados com 3% de sacarose (Synth), e gelificados com 4 g/l de Phytigel®, e manitol (Sigma-Aldrich) adicionado para dar potenciais hídricos finais de 0; -0,3; -0,6; -0,9; -1,2 MPa. Os tubos foram selados com filme plástico de polietileno e transferidos para a sala de crescimento sob as mesmas condições descritas anteriormente.

5.2.3. Avaliações de crescimento e biomassa

Após 30 dias foram medidas as variáveis: porcentagem de sobrevivência, número de brotações e raízes, comprimento da parte aérea (cm), comprimento das raízes (cm), massa fresca (Mf) e massa seca (Ms) medidos de acordo com Cha-um et al. (2006).

5.2.4. Análise de prolina

O teor de prolina livre foi determinado em duas duplicatas para cada uma das quatro réplicas biológicas, de acordo com Bates et al. (1973). Amostras de folhas (200 mg) foram homogeneizadas em ácido sulfosalicílico aquoso (Alphatec) (3% p/v; 12 ml). O homogeneizado filtrado (2 mL) reagiu com igual volume de ninidrina ácida (Sigma-Aldrich) e ácido acético (Neon) a 100°C durante 1 h e a reação foi terminada num banho de gelo. A mistura reaccional

foi extraída com 4 ml de tolueno (Alphatec) e misturada vigorosamente com um agitador durante 10-15 s. O sobrenadante contendo tolueno foi aspirado da fase aquosa e aquecido a temperatura ambiente. A absorbância foi registrada a 520 nm utilizando tolueno como um branco. A concentração de prolina ($\mu\text{mol/g PF}$) foi determinada a partir de uma curva padrão preparada com L-prolina (Sigma-Aldrich).

5.2.5. Análise de enzimas antioxidantes

5.2.5.1. Extração

Todos os passos na preparação do extrato enzimático foram realizados a 4°C. As amostras de folhas (100 mg) foram homogeneizadas em 1,5 ml de tampão fosfato de sódio 50 mM gelado (pH 7,0) incluindo 0,1 mM de ácido etilenodiaminatetracético-EDTA (Vetec) e polivinilpirrolidona-PVP (Sigma-Aldrich) (1% p/v) em almofariz e pistilo pré-refrigerados. O homogeneizado foi centrifugado a 14000 g durante 20 min a 4°C. O sobrenadante foi utilizado como um extrato enzimático bruto para os ensaios da enzima antioxidante (Peixoto et al., 1999).

5.2.5.2. Superóxido Dismutase (SOD)

A atividade específica de SOD foi ensaiada em termos de inibição da redução fotoquímica de NBT-nitroazul de tetrazólio (Sigma-Aldrich) (Beyer & Fridovich 1987). A mistura reacional (3 mL) consistia em 50 mM de tampão fosfato (pH 7,8) e 0,1 mM EDTA ao qual um sistema gerador de superóxido contendo metionina (Sigma-Aldrich) (14,3 mM), NBT (82,5 mM) e riboflavina (Sigma-Aldrich) (2,2 μM) foi adicionado. A reação foi iniciada adicionando enzima bruta (100 μl). A redução do NBT induzida por radicais livres foi medida no meio reacional contendo todos os reagentes, exceto a enzima. Os tubos foram mantidos 30 cm abaixo de uma fonte de luz (lâmpadas fluorescentes de $4 \times 20 \text{ W}$) por 6 min na câmara BOD ajustada para $25 \pm 2^\circ\text{C}$. A reação foi interrompida desligando a luz. Todos os reagentes juntamente com 100 μl de extrato de enzima foram incubados no escuro como o branco escuro. A redução do NBT foi medida pelo monitoramento da mudança na absorbância a 560 nm. As leituras de branco escuro foram utilizadas no cálculo das unidades enzimáticas. A atividade enzimática foi expressa como U SOD. 1 U da enzima SOD foi definida como a quantidade de enzima que causa cerca de 50% de inibição da redução de NBT nas condições do ensaio.

5.2.5.3. Catalase (CAT)

A atividade da CAT foi medida seguindo a decomposição do peróxido de hidrogênio- H_2O_2 como descrito por Cakmak e Marschner (1992) com algumas modificações. A atividade foi medida numa mistura reacional (1 ml) contendo tampão fosfato 50 mM (pH 7,0) e H_2O_2 (Merck) (10 mM). A reação foi iniciada pela adição de 50 μl de extrato de enzima e a atividade foi determinada monitorando a diminuição da absorbância a 240 nm ($\epsilon = 36 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) durante 2 min a intervalos de 15 s. A inclinação do ensaio de taxa (ΔA) foi usada para determinar a atividade enzimática, que foi expressa como $\mu\text{mol/min g Mf}$.

5.2.5.4. Ascorbato Peroxidase (APX)

A atividade de APX foi determinada de acordo com Nakano e Asada (1981). A mistura reacional (um volume total de 2 ml) consistiu em tampão fosfato de sódio 50 mM (pH 7,0), EDTA 0,1 mM, ascorbato de sódio 0,25 mM (Sigma-Aldrich), H_2O_2 1 mM e 100 μl de extrato de enzima. A oxidação de ascorbato dependente de H_2O_2 foi seguida por uma diminuição na absorbância a 290 nm ($\epsilon = 2,8 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) durante 5 min a intervalos de 30 s. A atividade da APX foi medida em termos de $\mu\text{mol/min g Mf}$.

5.2.6. Desenhos Experimentais e Análise Estatística

Utilizou-se o delineamento experimental inteiramente casualizado, em esquema fatorial 5 acessos \times 5 potenciais osmóticos, com cinco repetições por tratamento, contendo uma brotação por tubo por unidade experimental.

Os dados das variáveis foram submetidos à análise de variância. Para os potenciais osmóticos, aplicou-se o teste de regressão e, para os acessos, o teste de Scott-Knott com 5% de significância. O software estatístico SAS-9.4 (SAS Institute Inc., 2013) foi utilizado para todas as análises.

5.3. Resultados

5.3.1. Avaliação do crescimento

A redução do potencial hídrico do meio afetou significativamente o padrão de crescimento *in vitro* dos acessos de cana-de-açúcar. Houve efeito significativo da interação entre acessos e potenciais hídricos para as variáveis: número e comprimento das brotações e de raízes; e massa fresca e massa seca. Para sobrevivência houve efeito significativo isolado dos acessos e potenciais hídricos.

Houve redução linear da sobrevivência à medida que o potencial hídrico tornava-se mais negativo (Figura 1).

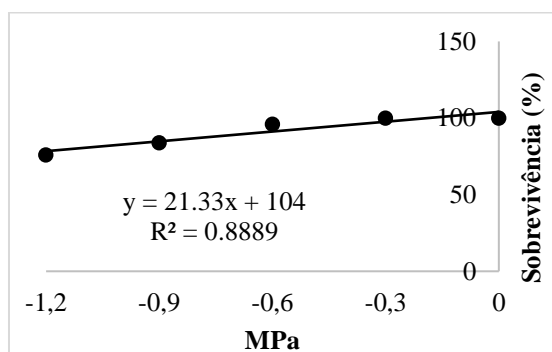


Figura 1: Efeito do estresse hídrico na porcentagem de sobrevivência de acessos de cana-de-açúcar aos 30 dias de cultivo *in vitro*.

O acesso *S. robustum*-Q45923 apresentou menor taxa de sobrevivência (72%), diferindo dos demais que atingiram 88 a 100% de sobrevivência (Tabela 1).

Tabela 1: Sobrevivência (%) de acessos de cana-de-açúcar, aos 30 dias de cultivo *in vitro* sob estresse hídrico

Acessos	Sobrevivência (%)
<i>S. robustum</i> (Q45923)	72 b
<i>S. robustum</i> (GH49)	96 a
<i>S. robustum</i> (MIA35301)	100 a
<i>S. spontaneum</i> (NSL291970)	100 a
<i>S. officinarum</i> (PI88652)	88 a
CV (%)	10,75

Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott ($p \leq 0,05$).

O aumento da concentração de manitol no meio de cultura promoveu diferentes respostas na emissão de brotações (Figura 2). Em *S. robustum* – GH-49 a menor emissão de brotações adventícias (1,09 brotações/explante) foi alcançada no potencial de -1,06 MPa, e para *S. officinarum* – PI88652 de -0.86 MPa com média de 0.44 brotações/explante. Por outro lado, a formação de brotações foi linear negativa em *S. robustum* – Q45923 e MIA35301 e *S. spontaneum* – NSL291970 com o decréscimo do potencial hídrico (Tabela 2). Na ausência de

estresse hídrico, o acesso *S. officinarum* – PI88652 apresentou maior média (11,0 brotações/explante), e nos dois tratamentos mais severos, não houve diferença estatística entre os acessos.

Para o comprimento das brotações houve resposta linear com redução significativa em *S. robustum* – MIA3530, e quadrática nos demais acessos com a redução do potencial. Os menores comprimentos foram notados em -1,01 MPa para *S. robustum* – Q45923 com 0,019 cm, -0,93 MPa para *S. robustum* – GH49 com 2,37 cm, -0,93 MPa para *S. officinarum* – PI88652 com 2,76 cm, e -1,02 MPa para *S. spontaneum* – NSL291970 com 3,50 cm, sendo este último o acesso que apresentou maior média de crescimento em todos os potenciais estudados (Tabela 2).

Quanto ao número de raízes houve resposta linear negativa para *S. robustum* – Q45923 e quadrática para os demais acessos. A maior indução de raízes ocorreu em -0,006 MPa com média de 4,83 raízes para *S. robustum* – MIA3530. Já a menor emissão de raízes ocorreu em -0,93 MPa com 1,0 raiz para *S. robustum* – GH49, -1,08 MPa com 0,02 raiz para *S. officinarum* – PI88652, e -0,96 MPa com 1,8 raízes em *S. spontaneum* – NSL291970, sendo que este último se destacou na maior produção de raízes (12,8) na ausência do estresse. E ainda, no tratamento mais severo, -1,2 MPa, somente *S. spontaneum* – NSL291970 emitiu raiz, porém não diferenciando estatisticamente da ausência de raiz dos demais acessos. Com o aumento do estresse, *S. robustum* – MIA35301 e *S. spontaneum* – NSL291970 não apresentaram diferença estatística (Tabela 2).

Considerando o comprimento das raízes, houve redução linear com o aumento do estresse hídrico em *S. robustum* – Q45923 e GH49. Para essa variável *S. robustum* – MIA3530 apresentou maior média (2,58 cm) em -0,19 MPa. Para *S. spontaneum* – NSL291970 e *S. officinarum* – PI88652 os menores comprimentos, 0,56 e 0,01 cm, foram observados em -0,49 MPa e -1,11 MPa, respectivamente. No tratamento controle, *S. robustum* – GH49 e MIA35301 apresentaram os menores comprimentos, e nos dois tratamentos mais severos não houve diferença estatística entre os acessos (Tabela 2).

Tabela 2: Número de brotações, comprimento de brotações, número de raízes e comprimento de raízes em acessos de cana-de-açúcar, aos 30 dias de cultivo *in vitro* sob estresse hídrico

Potencial hídrico (MPa)	Acessos				
	<i>S. robustum</i> (Q45923)	<i>S. robustum</i> (GH49)	<i>S. robustum</i> (MIA35301)	<i>S. spontaneum</i> (NSL291970)	<i>S. officinarum</i> (PI88652)
----- Número de brotações -----					
0	4,60 c	9,00 b	4,20 c	3,80 c	11,00 a
-0,3	3,80 b	5,60 a	3,20 b	1,60 c	2,40 c
-0,6	1,25 b	1,80 b	2,80 a	3,00 a	1,60 b
-0,9	1,00 a	2,00 a	1,80 a	2,20 a	2,25 a
-1,2	1,00 a	1,00 a	1,00 a	2,00 a	1,00 a
Equação	3,3333x + 4,3300	6,9841x ² + 14,9143x + 9,0571	2,60x + 4,16	1,00x + 3,12	12,8175x ² + 22,0976x + 9,9871
R ²	0,8321	0,9695	0,9877	0,2915	0,8613
CV (%)	12,29				
----- Comprimento de brotações (cm) -----					
0	10,50 b	9,20 b	8,10 c	18,60 a	8,00 c
-0,3	5,40 b	5,40 b	6,70 b	8,80 a	4,66 b
-0,6	1,12 c	2,20 c	3,20 b	6,20 a	3,44 b
-0,9	0,50 b	3,60 a	1,10 b	5,10 a	3,12 a
-1,2	0,20 b	2,37 a	0,44 b	3,20 a	3,00 a
Equação	10,8333x ² + 21,3666x + 10,5550	7,7381x ² + 14,4357x + 9,0379	6,9733x + 8,0920	13,7302x ² + 27,9762x + 17,7514	5,8214x ² + 10,8307x + 7,7999
R ²	0,9933	0,9152	0,956	0,9553	0,9785
CV (%)	11,54				
----- Número de raízes -----					
0	6,40 d	9,80 b	5,20 d	12,80 a	8,40 c
-0,3	4,60 a	4,40 a	3,60 b	2,60 b	5,00 a
-0,6	2,50 b	1,60 b	4,60 a	4,40 a	1,00 b
-0,9	1,00 b	0,80 b	2,20 a	3,80 a	0,75 b
-1,2	0,0 a	0,0 a	0,0 a	1,20 a	0,0 a
Equação	5,4667x + 6,18	9,8889x ² + 18,4000x + 9,5600	-3,6508x ² - 0,4476x + 4,8228	10,1587x ² + 19,5238x + 11,1886	7,1825x ² + 15,636x + 8,5329
R ²	0,9845	0,9889	0,8908	0,7256	0,9794
CV (%)	19,53				
----- Comprimento de raízes (cm) -----					
0	5,00 a	2,70 b	2,30 b	5,30 a	4,20 a
-0,3	4,10 a	1,40 c	2,90 b	2,10 c	2,60 b
-0,6	1,75 a	0,60 b	2,20 a	1,80 a	0,50 b
-0,9	1,00 a	0,30 a	0,80 a	1,20 a	0,4 a
-1,2	0,0 a	0,0 a	0,0 a	0,30 a	0,0 a
Equação	4,3667x + 4,9900	2,1667x + 2,3000	-2,7778x ² - 1,1000x + 2,4800	3,4127x ² + 7,7286x + 4,9343	3,4921x ² + 7,7238x + 4,2886
R ²	0,9648	0,8989	0,9358	0,9186	0,9743
CV (%)	17,48				

Médias seguidas pela mesma letra na linha não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott ($p \leq 0,05$).

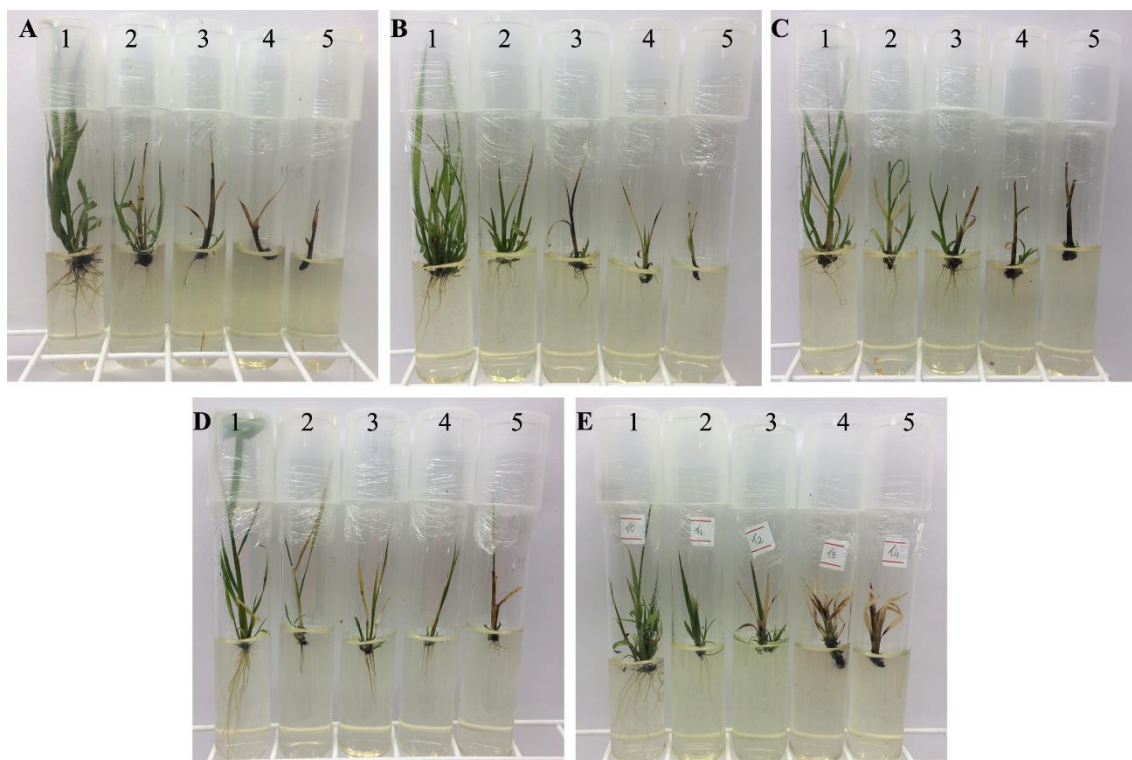


Figura 2: Brotações de cana-de-açúcar aos 30 dias de cultivo *in vitro* em diferentes potenciais hídricos. A – *S. robustum* (Q45923), B – *S. robustum* (GH49), C – *S. robustum* (MIA35301), D – *S. spontaneum* (NSL291970), E – *S. officinarum* – PI88652). 1 – 0 MPa; 2 – -0,3 MPa; 3 – -0,6 MPa; 4 – -0,9 MPa; 5 – -1,2 MPa.

5.3.2. Biomassa

Em relação à massa fresca de brotos, para *S. robustum* – MIA35301 houve redução linear com o aumento do estresse hídrico. Para *S. robustum* – Q45923 e GH49 as menores massas frescas, 0,13 g e 0,04 g, foram alcançadas nos potenciais -0,9 MPa e -1,02 Mpa, respectivamente. Em *S. spontaneum* – NSL291970 a massa fresca mais baixa, 0,05 g, foi obtida em -0,81 MPa, já em *S. officinarum* – PI88652 o potencial de -0,75 MPa foi o que mais ocasionou decréscimo na massa, gerando 0,12 g. Não houve diferença entre os acessos para -1,2 MPa.

A produção em massa seca dos brotos diminuiu nos acessos *S. robustum* – Q45923 e GH49, *S. spontaneum* – NSL291970 e *S. officinarum* – PI88652 em resposta ao déficit hídrico, com reduções de 36%, 80%, 42% e 22%, respectivamente. Na ausência de estresse não houve diferença entre os acessos, e para o tratamento mais severo, o acesso *S. robustum* – GH49 obteve menor massa.

Para as raízes houve redução linear negativa da massa para os acessos com o aumento do estresse. Na ausência de estresse, *S. spontaneum* – NSL291970 apresentou maior massa seca (0,0040 g), e *S. robustum* – Q45923, *S. spontaneum* – NSL291970 e *S. officinarum* – PI88652 maiores massas frescas, 0,0416 g, 0,0503 g e 0,0406 g, respectivamente. Em relação aos potenciais hídricos mais severos, não houve diferença entre os acessos.

Tabela 3: Biomassa (massa fresca e seca) de acessos de cana-de-açúcar, aos 30 dias de cultivo *in vitro* sob estresse hídrico.

Potencial hídrico (MPa)	Acessos				
	<i>S. robustum</i> (Q45923)	<i>S. robustum</i> (GH49)	<i>S. robustum</i> (MIA35301)	<i>S. spontaneum</i> (NSL291970)	<i>S. officinarum</i> (PI88652)
----- Massa fresca de brotações (g) -----					
0	0,3711 b	0,4576 a	0,3709 b	0,3677 b	0,4583 a
-0,3	0,2720 a	0,2355 a	0,2721 a	0,0922 b	0,1466 b
-0,6	0,1511 a	0,1054 a	0,1750 a	0,1386 a	0,1267 a
-0,9	0,1366 b	0,0605 b	0,2124 a	0,1043 b	0,2106 a
-1,2	0,1442 a	0,0442 a	0,1284 a	0,1149 a	0,1858 a
	0,2539x ² +	0,3943x ² +	0,1816x +	0,3903x ² +	0,5377x ² +
	0,5010x +	0,8071x +	0,3407	0,6328x +	0,8056x +
Equação y=	0,3786	0,4519		0,3325	0,4186
R ²	0,9804	0,9963	0,8411	0,7812	0,7769
CV (%)	4,74				
----- Massa seca de brotações (g) -----					
0	0,0454 a	0,0506 a	0,0342 a	0,0421 a	0,0441 a
-0,3	0,0378 a	0,0348 a	0,0358 a	0,0172 b	0,0275 b
-0,6	0,0145 a	0,0186 a	0,0288 a	0,0239 a	0,0207 a
-0,9	0,0344 a	0,0122 b	0,0355 a	0,0206 b	0,0340 a
-1,2	0,0289 a	0,0100 b	0,0233 a	0,0245 a	0,0343 a
	0,0376x ² +	0,0295x ² +		0,0379x ² +	0,0426x ² +
	0,0572x +	0,0699x +	ns	0,0560x +	0,0555x +
Equação y=	0,0462	0,0512		0,0388	0,0424
R ²	0,5456	0,9951	ns	0,7066	0,7369
CV (%)	0,92				
----- Massa fresca de raízes (g) -----					
0	0,0416 a	0,0285 b	0,0186 b	0,0503 a	0,0406 a
-0,3	0,0283 a	0,0045 b	0,0082 b	0,0053 b	0,0013 b
-0,6	0,0050 a	0,0021 a	0,0052 a	0,0040 a	0,0011 a
-0,9	0,0007 a	0,0002 a	0,0020 a	0,0035 a	0,0000 a
-1,2	0,0000 a	0,0000 a	0,0000 a	0,0010 a	0,0000 a
	0,0368x +	0,0204x +	0,0145x +	0,0334x +	0,0275x +
Equação y=	0,0372	0,0193	0,0155	0,0328	0,0251
R ²	0,8685	0,6387	0,8839	0,5703	0,5307
CV (%)	0,82				
----- Massa seca de raízes (g) -----					
0	0,0029 b	0,0015 c	0,0014 c	0,0040 a	0,0023 c
-0,3	0,0026 a	0,0002 b	0,0005 b	0,0009 b	0,0009 b
-0,6	0,0008 a	0,0001 a	0,0003 a	0,0006 a	0,0000 a
-0,9	0,0000 a	0,0000 a	0,0001 a	0,0002 a	0,0000 a
-1,2	0,0000 a	0,0000 a	0,0000 a	0,0000 a	0,0000 a
	0,0028x +	0,0011x +	0,0011x +	0,0029x +	0,0018x +
Equação y=	0,0029	0,0010	0,0011	0,0028	0,0017
R ²	0,8941	0,5991	0,7891	0,7126	0,7355
CV (%)	0,07				

Médias seguidas pela mesma letra na linha não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott ($p \leq 0,05$). ns = não significativo

5.3.3. Prolina

Houve efeito significativo da interação entre acessos e potenciais hídricos para o teor de prolina (Tabela 4). O acúmulo de prolina foi induzido em todos os acessos com o aumento da concentração de manitol, com exceção para *S. officinarum* - PI88652, em que houve acúmulo somente até -0,56 MPa na tentativa de suprir a necessidade de ajuste osmótico. Após este potencial ocorreu a menor síntese do osmólito, demonstrando a recuperação da planta e a

possível tolerância do acesso. O teor máximo de prolina foi detectado no acesso *S. robustum* - Q45923 (28,07 $\mu\text{mol/g}$ Mf) em -1,2 MPa, porém não diferindo estatisticamente de *S. robustum* - GH-49 (21,10 $\mu\text{mol/g}$ Mf) e *S. spontaneum* - NSL291970 (24,45 $\mu\text{mol/g}$ Mf) para este potencial. No tratamento controle não houve diferença entre os acessos. Já para os demais tratamentos *S. robustum* - Q45923 se destacou apresentando as maiores médias.

Tabela 4: Teor de prolina livre ($\mu\text{mol/g}$ Mf) nos acessos de cana-de-açúcar, aos 30 dias de cultivo *in vitro* sob estresse hídrico.

Potencial hídrico (Mpa)	Acessos				
	<i>S. robustum</i> (Q45923)	<i>S. robustum</i> (GH49)	<i>S. robustum</i> (MIA35301)	<i>S. spontaneum</i> (NSL291970)	<i>S. officinarum</i> (PI88652)
0	1,9482 aB	2,6421 aC	3,4355 aB	2,3145 aD	1,9437 aB
-0,3	2,9253 cB	16,5837 aA	6,278 cB	10,771 bC	7,7151 cA
-0,6	5,3459 bB	12,3126 aB	5,5376 bB	9,4547 aC	6,2025 bA
-0,9	8,2974 bB	12,3255 aB	5,9051 bB	16,1684 aB	2,9909 bB
-1,2	28,0704 aA	21,1017 aA	12,3783 bA	24,4512 aA	3,4127 cB
Equação y=	$30,256x^2 + 17,102x + 3,2402$	$-10,887x + 6,4609$	$-5,8376x + 3,2044$	$-16,557x + 2,6978$	$-9,8398x^2 - 11,212x + 3,039$
R ²	0,9399	0,5714	0,6846	0,9064	0,4866
CV (%)	12,42				

Médias seguidas pela mesma letra minúscula na linha e maiúscula na coluna não diferem pelo teste de Scott-Knott ($p \leq 0,05$).

5.3.4. Enzimas antioxidantes

Em relação à atividade das enzimas antioxidantes, houve efeito significativo entre os acessos e os potenciais hídricos (Tabela 5). A atividade de SOD foi induzida com o aumento do estresse em *S. spontaneum* - NSL291970 e até -0,57 MPa em *S. robustum* - MIA35301, no restante dos acessos a atividade não foi observada. No maior nível de estresse a maior média de atividade enzimática foi atingida por *S. robustum* - GH49 (1,3804 $\mu\text{mol/min g}$ Mf).

Para APX houve maior atividade da enzima somente para os acessos *S. robustum* - GH49 e MIA35301 com o aumento do estresse, demonstrando que neste último acesso, o H_2O_2 produzido pela atividade da SOD foi catalisado pela ação da enzima. No tratamento controle, maiores médias foram observadas em *S. robustum* - Q45923 (4,6273 $\mu\text{mol/min g}$ Mf) e *S. officinarum* - PI88652 (4,7063 $\mu\text{mol/min g}$ Mf). Sob condições de -1,2 MPa, *S. robustum* - GH49 e *S. officinarum* - PI88652 apresentaram maior atividade da SOD, 5,2889 e 5,8542 $\mu\text{mol/min g}$ Mf, respectivamente, evidenciando que existe diferença entre as espécies, e ainda, dentro da mesma espécie de cana-de-açúcar.

Já considerando a CAT, não houve aumento significativo da atividade desta enzima para nenhum dos acessos estudados. Este pode ser o resultado de uma afinidade muito maior de peroxidases do que de catalase para H_2O_2 . *S. robustum* - Q45923 se destacou apresentando a maior média nos níveis mais elevados de estresse.

Tabela 5: Atividade de enzimas antioxidantes em acessos de cana-de-açúcar, aos 30 dias de cultivo *in vitro* sob estresse hídrico.

Potencial hídrico (Mpa)	Acessos				
	<i>S. robustum</i> (Q45923)	<i>S. robustum</i> (GH-49)	<i>S. robustum</i> (MIA35301)	<i>S. spontaneum</i> (NSL291970)	<i>S. officinarum</i> (PI88652)
----- SOD (U SOD) -----					
0	1,9050 aA	1,3725 bA	0,8983 cB	0,8464 cB	0,9612 cA
-0,3	1,2455 aC	1,4187 aA	1,2850 aA	0,8840 bB	0,9044 bA
-0,6	1,4473 aB	1,4112 aA	0,9430 bB	0,8671 bB	0,9071 bA
-0,9	1,5004 aB	1,1503 bB	1,1150 bA	1,1885 bA	0,9548 bA
-1,2	1,1393 bC	1,3804 aA	0,9473 bB	1,1105 bA	1,0239 bA
Equação y=	0,4255x + 1,7028	ns	-0,4722x ² - 0,5426x + 0,4671	-0,2776x + 0,8128	ns
R ²	0,4684	ns	0,2488	0,6912	ns
CV (%)	3,69				
----- CAT (μmol/min g Mf) -----					
0	0,5334 aA	0,3383 bA	0,5212 aA	0,5705 aA	0,3497 bA
-0,3	0,4737 aA	0,3433 bA	0,5089 aA	0,5628 aA	0,3769 bA
-0,6	0,5246 aA	0,2816 cA	0,2870 cB	0,5703 aA	0,3905 bA
-0,9	0,5273 aA	0,2469 cA	0,4461 aA	0,3594 bB	0,3634 bA
-1,2	0,5897 aA	0,2647 cA	0,2913 cB	0,4802 bA	0,2506 cB
Equação y=	Ns	0,0812x + 0,3437	0,1742x + 0,5154	0,1280x + 0,5854	-0,2545x ² + 0,2348x + 0,3428
R ²	Ns	0,7788	0,5187	0,4384	0,9573
CV (%)	3,50				
----- APX (μmol/min g Mf) -----					
0	4,6273 aA	1,9388 bC	1,0041 bB	2,0117 bA	4,7063 aA
-0,3	1,6093 cB	4,2901 bB	3,4457 bA	2,1163 cA	5,6414 aA
-0,6	2,9613 bB	5,1731 aA	1,3157 cB	0,9869 cA	5,7105 aA
-0,9	2,8748 cB	4,0883 bB	1,9881 cB	1,7749 cA	5,3253 aA
-1,2	2,3300 cB	5,2889 aA	3,2795 bA	1,8472 cA	5,8542 aA
Equação y=	2,7841x ² + 4,4505x + 4,0474	-3,3881x ² - 6,2318x + 2,2463	-1,0310x + 1,5880	ns	ns
R ²	0,3993	0,7614	0,1923	ns	ns
CV (%)	8,68				

Médias seguidas pela mesma letra minúscula na linha e maiúscula na coluna não diferem pelo teste de Scott-Knott (p≤0,05). ns = não significativo

5.4. Discussão

5.4.1. Avaliação do crescimento

A via de sinalização de qualquer estresse abiótico envolve certas etapas-chave, como percepção de sinal, transdução, respostas, combinadas com a ativação de reações fisiológicas e metabólicas (Pérez-Clemente et al., 2013; Liu et al., 2014). Nesse processo, as células vegetais percebem primeiro o estímulo de estresse através de sensores ou receptores localizados principalmente na membrana celular. Então, as moléculas sinalizadoras receptoras ativam as intracelulares através de segundos mensageiros como, fosfato de inositol, nucleotídeos cíclicos, EROS, óxido nítrico, açúcares e íons de cálcio. Subsequentemente, esses segundos mensageiros iniciam as vias de sinalização correspondentes para transduzir os sinais que modulam a expressão de genes responsivos ao estresse, regulando vários processos fisiológicos e metabólicos (Bhargava e Sawant, 2013; Joshi et al., 2016).

Em condição de deficiência hídrica, as plantas apresentam uma série de alterações morfofisiológicas como parte das estratégias para reduzir os efeitos deletérios da baixa disponibilidade de água, constituindo, portanto, mecanismos de tolerância à seca (Kramer, 1980). Inman-Bamber e Smith (2005) relatam a variação genotípica em cana-de-açúcar quanto à tolerância ao déficit hídrico e que esta é expressa em diferentes níveis organizacionais que incluem desde respostas celulares até modificações morfológicas (Passioura, 1997).

A deficiência hídrica afeta o rendimento da cana-de-açúcar, reduzindo o tamanho das plantas em geral, e algumas variáveis como a produção de perfilhos; número, altura e diâmetro de colmos; área foliar e finalmente o peso individual dos colmos (Rao et al., 2005; Robertson et al., 1999). Segundo Silva et al. (2008), a variação na altura da planta é um indicativo de tolerância ou susceptibilidade do gênero *Saccharum* à deficiência hídrica.

O estresse hídrico induzido por manitol também causou uma diminuição acentuada em atributos de crescimento como o comprimento de brotos e área foliar em sete cultivares de cana-de-açúcar, com o nível de redução variando entre os diferentes genótipos (Cha-Um et al., 2012). Munawarti et al. (2014) trabalhando com *S. spontaneum* atribuíram a menor redução na altura dos acessos BOT-53 e BOT-54 à tolerância à seca.

Variações na disponibilidade de água no solo promovem diferenças no desenvolvimento do sistema radicular das plantas, afetando a absorção de nutrientes, e sistema radicular profundo é característica de cultivares tolerantes à seca. Diante disso, plantas submetidas à condição de seca apresentam alterações que podem prevenir e tolerar a perda de água, e nestas alterações, o sistema radicular é a primeira região da planta a detectar e sinalizar às demais células e órgãos os efeitos do estresse (Taiz e Zeiger, 2009).

Do mesmo modo que neste estudo, o comprimento da raiz também diminuiu em todas as sete cultivares sob estresse osmótico em trabalho realizado por Cha-Um et al. (2012).

5.4.2. Biomassa

A redução de massa fresca e seca de raízes e brotos é explicada pelo fato de haver declínio da emissão e comprimento destes à medida que se reduz o potencial do meio. Mesmo utilizando-se de estratégias morfológicas para evitar os efeitos negativos da deficiência hídrica, as plantas de cana-de-açúcar apresentam decréscimos significativos na produção de fitomassa, reflexo de alterações fisiológicas impostas pela baixa disponibilidade hídrica, como a redução da atividade fotossintética (Singels et al., 2005). Essa sensibilidade deve-se à redução da divisão celular consequente do impacto da falta de água sobre a taxa de expansão das células, devido à perda de turgor (Taiz e Zeiger, 2009).

Redução de 35% na fitomassa em plantas jovens de cana-de-açúcar foi verificada devido à imposição da restrição hídrica em um período de alta demanda evaporativa (Inman-Bamber, 2004). Cha-Um e Kirdmanee (2008) trabalhando com *S. officinarum* observaram o decréscimo na massa fresca e seca de plântulas submetidas ao déficit hídrico em condições de seca extrema utilizando 300 e 400 mM de manitol. Medeiros et al. (2013) trabalhando com duas variedades

de cana-de-açúcar, RB867515 e RB962962, observaram que apenas a variedade RB867515 diminuiu em resposta à seca em massa seca de brotos e raízes.

5.4.3. Prolina

A prolina é um dos osmólitos orgânicos mais importantes que se acumula em várias espécies de plantas em resposta aos estresses ambientais, como seca, salinidade, radiação UV, metais pesados e temperaturas extremas (Verbruggen e Hermans, 2008).

O aumento da concentração de prolina nas plantas estressadas pode ser uma adaptação para superar a condição de estresse, fornecendo constantemente energia para sobrevivência e crescimento, por atuar no ajuste osmótico auxiliando no controle da entrada e saída de água na célula, no citoplasma e vacúolos (Jaleel et al., 2007). Outras funções ainda são atribuídas a este aminoácido, tais como: antioxidante na eliminação de espécies reativas de oxigênio (ROS) (Molinari et al., 2007; Tuteja, 2007), proteção da membrana plasmática e integridade de macromoléculas (Vanrensburg et al., 1993; Silveira et al., 2003) e como fonte de carbono e nitrogênio (Gupta e Huang, 2014).

Em cana-de-açúcar, uma conexão positiva entre acréscimo de prolina e tolerância ao estresse hídrico foi observada por Abbas et al. (2014) ao avaliarem treze variedades sob estresse hídrico induzido por polietilenoglicol em casa de vegetação, distinguindo os genótipos mais tolerantes. Resultados similares também foram encontrados por Cha-Um e Kirdmanee (2008) em *S. officinarum* na presença de manitol, e por Patade et al. (2012) em culturas de calos de *S. officinarum* cv. Co86032, na presença de 20% de polietilenoglicol. No entanto, alguns autores sustentam a hipótese de que o acúmulo de prolina é um sintoma de estresse e não uma propriedade adaptativa (Rampino et al., 2006; Sanchez-Rodriguez et al., 2010). Cia et al. (2012) relataram uma ampla controvérsia sobre as propriedades protetoras do aumento da prolina solúvel em folhas de plantas sob estresse por seca, em que as variedades tolerantes apresentaram menor acúmulo de prolina em comparação com as sensíveis após 10 dias de estresse hídrico em casa de vegetação. Errabi et al. (2007) também encontraram resultados similares em culturas de calos de *Saccharum* sp.

5.4.4. Enzimas antioxidantes

As espécies reativas de oxigênio (EROS) são geradas em células vegetais pelo metabolismo celular normal ou devido a condições ambientais desfavoráveis como a seca, a salinidade, os metais pesados, herbicidas, deficiência nutricional ou radiação. As EROS são altamente citotóxicas e podem reagir com diversos metabólitos causando danos oxidativos a enzimas, proteínas, lipídios e ácidos nucleicos. Suas produções são controladas por várias enzimas de sistemas de defesa antioxidante (Karuppanapandian et al., 2011). A SOD, como metaloenzima, é a primeira enzima dos processos de desintoxicação, transformando O_2^- para H_2O_2 (Sen, 2012). Este H_2O_2 produzido pode ser convertido em H_2O e O_2 pela CAT ou, somente em H_2O , pela ação da APX (Noctor e Foyer, 1998).

Neste estudo foi demonstrado que a atividade enzimática foi ativada apenas em alguns acessos com o aumento do estresse hídrico, evidenciando que possivelmente o estresse induzido não foi suficiente para produzir EROS, ou que estas foram controladas pela ação do sistema de defesa antioxidante não enzimático, pela ação da prolina, por exemplo.

Se o estresse osmótico for muito forte ou persiste por muito tempo, pode-se também observar uma diminuição da atividade enzimática antioxidante, como já foi observado em culturas de calo de cana-de-açúcar (Patade et al., 2012) e *Sesuvium portulacastrum* (Lokhande et al., 2010a, b), e em plantas de *Kentucky bluegrass* (Wang e Huang, 2004).

A atividade de SOD, APX e CAT sob estresse hídrico induzidos com técnicas de cultura de tecidos em uma ampla gama de espécies de plantas já foi relatada. Balen et al. (2013) comparando atividades enzimáticas de tecidos de cactos expostos a NaCl e manitol, relataram que a resposta das atividades de APX foi maior do que a atividade de CAT. Chai et al. (2005) trabalhando com genótipos de banana, observaram que as atividades mais elevadas de APX e

SOD foram associadas a maior proteção contra lesão oxidativa induzida pelo estresse hídrico. Shehab et al. (2010) ao analisarem plantas de arroz sob estresse hídrico, concluíram que o aumento em duas vezes da atividade enzimática é um forte indício de que o tratamento da seca realmente levou ao estresse oxidativo. Torabi e Niknam (2011) mostraram tendências diferentes na atividade de enzimas antioxidantes em duas espécies de *Salicornia* sob sal e estresses de seca, evidenciando o aumento da atividade em uma das espécies analisadas.

Mecanismos de proteção ao estresse hídrico foram observados nos acessos de cana-de-açúcar estudados, indicando que os esforços a nível de planta foram necessários para lidar com o estresse. O ajuste osmótico desempenhou um papel importante na retenção de água, assim como a redução do crescimento e a atividade antioxidante, servindo como base para a seleção de acessos mais tolerantes, para futuros programas de melhoramento das espécies.

5.5. Conclusões

Existe diferença entre as espécies, e ainda, dentro da mesma espécie de cana-de-açúcar quando submetidas ao estresse hídrico *in vitro*.

S. officinarum apresenta melhores resultados, demonstrando ser mais tolerante ao estresse hídrico.

A prolina pode ser utilizada como um indicador bioquímico de resposta ao estresse hídrico em acessos de cana-de-açúcar.

O acúmulo de prolina é intensificado nos acessos de *S. robustum* e *S. spontaneum*.

A atividade de CAT permanece inalterada com o aumento do estresse nos acessos avaliados.

5.6. Referências Bibliográficas

- Abbas, S. R., Ahmad, S. D., Sabir, S. M., & Shah, A. H. (2014). Detection of drought tolerant sugarcane genotypes (*Saccharum officinarum*) using lipid peroxidation, antioxidant activity, glycine-betaine and proline contents. *Journal of Soil Science and Plant Nutrition*, 14(1), 233-243. <https://doi.org/10.4067/S0718-95162014005000019>
- Albiski, F., Najla, S., Sanoubar, R., Alkabani, N., & Murshed, R. (2012). *In vitro* screening of potato lines for drought tolerance. *Physiology and Molecular Biology of Plants*, 18(4), 215-321. <https://doi.org/10.1007/s12298-012-0127-5>
- Ashraf, M., & Foolad, M. R. (2007). Roles of glycine betaine and proline in improving plant abiotic stress resistance. *Environmental and Experimental Botany*, 59, 206-216. <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2005.12.006>
- Azevedo Neto, A. D., Prisco, J. T., Enéas-Filho, J., De Abreu, C. E. B., & Gomes-Filho, E. (2006). Effect of salt stress on antioxidative enzymes and lipid peroxidation in leaves and roots of salt-tolerant and salt-sensitive maize genotypes. *Environmental and Experimental Botany*, 56, 87-94. <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2005.01.008>
- Balen, B., Tkalec, M., Rogie, T., Simac, M., Stefanie, P. P., Roncevie, S., ... Krsnik-Rasol, M. (2013). Effects of iso-osmotic NaCl and mannitol on growth, proline content, and antioxidant defense in *Mammillaria gracilis* Pfeiff. *in vitro*-grown cultures. *In vitro Cellular and Developmental Biology-Plant*, 49, 421-432. <https://doi.org/10.1007/s11627-013-9523-y>
- Basu, S., Ramegowda, V., Kumar, A., & Pereira, A. (2016). Plant adaptation to drought stress. *F1000Research*, 5(F1000 Faculty Rev.), 1554. <https://doi.org/10.12688/f1000research.7678.1>
- Bates, L. S., Waldren, R. P., & Teare, I. D. (1973). Rapid determination of free proline for water-stress studies. *Plant Soil*, 39, 205-207. <https://doi.org/10.1007/BF00018060>

- Beyer, W. F., & Fridovich, I. (1987). Assaying for superoxide dismutase activity: Some large consequences of minor changes in condition. *Analytical Biochemistry*, 161, 559-566. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(87\)90489-1](https://doi.org/10.1016/0003-2697(87)90489-1)
- Bhargava, S., & Sawant, K. (2013). Drought stress adaptation: Metabolic adjustment and regulation of gene expression. *Plant Breeding*, 132, 21-32. <https://doi.org/10.1111/pbr.12004>
- Cakmak, I., & Marschner, H. (1992). Magnesium deficiency and high light intensity enhance activities of superoxide dismutase, ascorbate peroxidase, and glutathione reductase in bean leaves. *Plant Physiology*, 98, 1222-1227. <https://doi.org/10.1104/pp.98.4.1222>
- Chai, T. T., Fadzillah, N. M., Kusnan, M., & Mahmood, M. (2005). Water stress-induced oxidative damage and antioxidant responses in micropropagated banana plantlets. *Biologia Plantarum*, 49(1), 153-156. <https://doi.org/10.1007/s00000-005-3156-9>
- Cha-Um, S., & Kirdmanee, C. (2008). Effect of osmotic stress on proline accumulation, photosynthetic abilities and growth of sugarcane plantlets (*Saccharum officinarum* L.). *Pakistan Journal of Botany*, 40(6), 2541-2552.
- Cha-Um, S., Supaibulwatana, K., & Kirdmanee, C. (2006). Water relation, photosynthetic ability, and growth of Thai Jasmine rice (*Oryza sativa* L. ssp. *indica* cv. KDML 105) to salt stress by application of exogenous glycinebetaine and choline. *Journal of Agronomy and Crop Science*, 192, 25-36. <https://doi.org/10.1111/j.1439-037X.2006.00186.x>
- Cha-Um, S., Wangmoon, S., Mongkolsiriwatana, C., Ashraf, M., & Kirdmanee, C. (2012). Evaluating sugarcane (*Saccharum* sp.) cultivars for water deficit tolerance using some key physiological markers. *Plant Biotechnology*, 29, 431-439. <https://doi.org/10.5511/plantbiotechnology.12.0726a>
- Cia, M. C., Guimarães, A. C. R., Medici, L. O., Chabregas, S. M., & Azevedo, R. A. (2012). Antioxidant responses to water deficit by drought-tolerant and sensitive sugarcane varieties. *Annals of Applied Biology*, 161, 313-324. <https://doi.org/10.1111/j.1744-7348.2012.00575.x>
- Errabii, T., Gandonou, C. B., Essalmani, H., Abrini, J., Idaomar, M., & Senhaji, N. S. (2007). Effects of NaCl and mannitol induced stress on sugarcane (*Saccharum* sp.) callus cultures. *Acta Physiologiae Plantarum*, 29, 95-102. <https://doi.org/10.1007/s11738-006-0006-1>
- Filippou, P., Bouchagier, P., Skotti, E., & Fotopoulos, V. (2014). Proline and reactive oxygen/nitrogen species metabolism is involved in the tolerant response of the invasive plant species *Ailanthus altissima* to drought and salinity. *Environmental and Experimental Botany*, 97, 1-10, 2014. <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2013.09.010>
- Gupta, B., & Huang, B. (2014). Mechanism of salinity tolerance in plants: Physiological, biochemical, and molecular characterization. *International Journal of Genomics*, 1, 1-18. <https://doi.org/10.1155/2014/701596>
- Inman-Bamber, N. G. (2004). Sugarcane water stress criteria for irrigation and drying off. *Field Crops Research*, 89, 107-122. <https://doi.org/10.1016/j.fcr.2004.01.018>
- Inman-Bamber, N. G., & Smith, D. M. (2005). Water relations in sugarcane and response to water deficits. *Field Crops Research*, 92, 185-202. <https://doi.org/10.1016/j.fcr.2005.01.023>
- Jaleel, C. A., Manivannan P., Sankar, B., Kishorekumar, A., & Panneersevam, R. (2007). Calcium chloride effectS on salinity-induced oxidative stress, proline metabolism and indole alkaloid accumulation in *Catharanthus roseus*. *Comptes Rendes Biologies*, 330(9), 674-683. <https://doi.org/10.1016/j.crv.2007.07.002>
- Joshi, R., Wani, S. H., Singh, B., Bohra, A., Dar, Z. A., Lone, A. A., ... Pareek-Singla, S. L. (2016). Transcription factors and plants response to drought stress: Current understanding and future directions. *Frontiers in Plant Science*, 7, 1029. <https://doi.org/10.3389/fpls.2016.01029>
- Kacem, N. S., Delporte, F., Muhovski, Y., Djekoun, A., & Watillon, B. (2017). *In vitro* screening of durum wheat against water-stress mediated drought polyethylene glycol.

- Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*, 15, 239-247.
<https://doi.org/10.1016/j.jgeb.2017.04.004>
- Karuppanapandian, T., Moon, J. H., Kim, C., Manoharan, K., & Kim, W. (2011). Reactive oxygen species in plants: Their generation, signal transduction, and scavenging mechanisms. *Australian Journal Crop Science*, 5(6), 709-725.
- Kramer, P. J. (1980). Drought stress, and the origins of adaptations. In N. C. Turner, & P. J. Kramer (Eds.), *Adaptation of plants to water and high temperature stress* (pp. 7-22). New York, Wiley.
- Liu, J. H., Peng, T., & Dai, W. (2014). Critical cis-acting elements and interacting transcription factors: Key players associated with abiotic stress responses in plants. *Plant Molecular Biology Reporter*, 32, 303-317. <https://doi.org/10.1007/s11105-013-0667-z>
- Lokhande, V. H., Nikam, T. D., & Suprasanna, P. (2010a). Differential osmotic adjustment to iso-osmotic NaCl and PEG stress in the *in vitro* cultures of *Sesuvium portulacastrum* (L.) L. *Journal of Crop Science Biotechnology*, 13, 251-256. <https://doi.org/10.1007/s12892-010-0008-9>
- Lokhande, V. H., Nikam, T. D., & Suprasanna, P. (2010b). Biochemical, physiological and growth changes in response to salinity in callus cultures of *Sesuvium portulacastrum* L. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, 102, 17-25. <https://doi.org/10.1007/s11240-010-9699-3>
- Mccree, K. J., Kallsen, C. E., & Richardson, S. G. (1984). Carbon balance of sorghum plants during osmotic adjustment to water stress. *Plant Physiology*, 76, 898-902. <https://doi.org/10.1104/pp.76.4.898>
- Medeiros, D. B., Silva, E. C., Nogueira, R. J. M. C., Teixeira, M. M., & Buckeridge, M. S. (2013). Physiological limitations in two sugarcane varieties under water suppression and after recovering. *Theoretical and Experimental Plant Physiology*, 25(3), 213-222. <https://doi.org/10.1590/S2197-00252013000300006>.
- Mittler, R. Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. *Trends in Plant Science*, v. 7, p. 405-410, 2002.
- Molinari, H. B. C., Marur, C. J., Daros, E., Campos, M. K. F., Carvalho, J. F. R. P., Bessalho-Filho, J. C., ... Vieira, L. G. E. (2007). Evaluation of the stress-inducible production of proline in transgenic sugarcane (*Saccharum* spp.) osmotic adjustment, chlorophyll fluorescence and oxidative stress. *Physiologia Plantarum*, 130, 218-229. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.2007.00909.x>
- Munawarti, A., Taryono, Semiarti, E., & Sismindari, S. (2014). Morphological and Biochemical Responses of Glagah (*Saccharum spontaneum* L.) Accessions to Drought Stress. *Journal of Tropical Life Science*, 4(1), 61-66. <https://doi.org/10.11594/jtls.04.01.10>
- Murashige, T., & Skoog, F. A. (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*, 15, 473-497. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x>
- Nakano, Y., & Asada, K. (1981). Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate-specific peroxidase in spinach chloroplasts. *Plant and Cell Physiology*, 22, 867-880. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.pcp.a076232>
- Noctor, G., & Foyer, C. H. (1998). Ascorbate and glutathione: Keeping active oxygen under control. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 49, 249-79. <https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.49.1.249>
- Oliveira, E. C. A., Oliveira, R. I., Andrade, B. M. T., Freire, F. J., Júnior, M. A. L., & Machado, P. R. (2010). Crescimento e acúmulo de matéria seca em variedades de cana-de-açúcar cultivadas sob irrigação plena. *Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental*, 14(9), 951-960. <https://doi.org/10.1590/S1415-43662010000900007>

- Passioura, J. B. (1997). Drought and drought tolerance. In E. Belhassen (Ed.), *Drought tolerance in higher plants. Genetical, physiological and molecular biological analysis* (pp. 1-5). Dordrecht, Kluwer.
- Patade, V. Y., Bhargava, S., & Suprasanna, P. (2012). Effects of NaCl and iso-osmotic PEG stress on growth, osmolytes accumulation and antioxidant defense in cultured sugarcane cells. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, 108, 279-286. <https://doi.org/10.1007/s11240-011-0041-5>
- Patade, V. Y., Bhargava, S., & Suprasanna, P. (2014). Better osmotic adjustment mediates salt and PEG stress tolerance in primed plants of contrasting cultivars of sugarcane. *Sugar Tech.*, 17(4), 348-355. <https://doi.org/10.1007/s12355-014-0350-1>
- Patade, V. Y., Suprasanna, P., & Bapat, V. A. (2008). Effects of salt stress in relation to osmotic adjustment on sugarcane (*Sacharum officinarum* L.) callus cultures. *Plant Growth Regulation*, 55, 169-173. <https://doi.org/10.1007/s10725-008-9270-y>
- Peixoto, P. H. P., Cambraia, J., Sant'Anna, R., Musquim, R., & Moreira, M. A. (1999). Aluminum effect on lipid peroxidation and on the activities of enzymes of oxydative metabolism in sorghum. *Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal*, 11(3), 137-143.
- Pérez-Clemente, R. M., Vives, V., Zandalinas, S. I., López-Climent, M. F., Muñoz, V., & Gómez-Cadenas, A. (2013). Biotechnological approaches to study plant responses to stress. *Biomed Research International*, 2013, 654120. <https://doi.org/10.1155/2013/654120>
- Pimentel, C. (2004). *A relação da planta com a água* (p. 191). Seropédica: EDUR.
- Puente-Garza, C. A., Meza-Miranda, C., Ochoa-Martínez, D., & García-Lara, S. (2017). Effect of *in vitro* drought stress on phenolic acids, flavonols, saponins, and antioxidant activity in *Agave salmiana*. *Plant Physiology Biochemistry*, 115, 400-407. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2017.04.012>
- Ramesh, P. (2000). Effect of different levels of drought during the formative phase on growth parameters and its relationship with dry matter accumulation in sugarcane. *Journal of Agronomy & Crop Science*, 185, 83-89. <https://doi.org/10.1046/j.1439-037x.2000.00404.x>
- Rampino, P., Pataleo, S., Gerardi, C., Mita, G., & Perrotta, C. (2006). Drought stress response in wheat: Physiological and molecular analysis of resistant and sensitive genotypes. *Plant, Cell & Environment*, 29, 2143-2152. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3040.2006.01588.x>
- Rao, C. M., Kumar, M. V., & Reddy, L. K. (2005). Management of sugarcane clones under limited moisture situations (drought) at formative stage. *Indian Sugar*, 949-953.
- Robertson, M. J., Inmam-Bamber, N. G., Muchow, R. C., & Wood, A. W. (1999). Physiology and productivity of sugarcane with early and midseason water deficit. *Field Crops Research*, 64, 211-227. [https://doi.org/10.1016/S0378-4290\(99\)00042-8](https://doi.org/10.1016/S0378-4290(99)00042-8)
- Said, E. M., Mahmoud, R. A., Al-Akshar, R., & Safwat, G. (2015). Drought stress tolerance and enhancement of banana plantlets *in vitro*. *Austin Journal of Biotechnology & Bioengineering*, 2(2).
- Sanchez-Rodriguez, R., Rubio-Wilhelmi, M. M., Cervilla, L. M., Blasco, B., Rios, J. J., Rosales, M. A., ... Ruiz, J. M. (2010). Genotypic differences in some physiological parameters symptomatic for oxidative stress under moderate drought in tomato plants. *Plant Science*, 178, 30-40. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2009.10.001>
- SAS Institute Inc. (2013). *Statistical Analysis System*. SAS 9.4 Help and Documentation, Cary, NC: SAS Institute Inc. Retrieved from http://www.sas.com/en_us/software/sas9.html
- Sen, A. (2012). Oxidative stress studies in plant tissue culture. In M. A. El-Missiry (Ed.), *Biochemistry, Genetics and Molecular Biology: Antioxidant Enzyme* (Chapter 3). InTech.
- Shehab, G. G., Ahmed, O. K., & El-Beltagi, H. S. (2010). Effects of various chemical agents for alleviation of drought stress in rice plants (*Oryza sativa* L.). *Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca*, 38(1), 139-148. <https://doi.org/10.15835/nbha3813627>

- Silva, M. A., Silva, J. A. G., Enciso, J., Sharma, V., & Jifon, J. (2008). Yield components as indicators of drought tolerance of sugarcane. *Scientia Agricola*, 65(6), 620-627. <https://doi.org/10.1590/S0103-90162008000600008>
- Silveira, J. A. G., Viégas, R. A., Rocha, I. M. A., Moreira, A. C. O. M., Moreira, R. A., & Oliveira, J. T. A. (2003). Proline accumulation and glutamine synthetase activity are increased by salt-induced proteolysis in cashew leaves. *Journal of Plant Physiology*, 160, 115-123. <https://doi.org/10.1078/0176-1617-00890>
- Singels, A., Donaldson, R. A., & Smit, M. A. (2005). Improving biomass production and partitioning in sugarcane: theory and practice. *Field Crops Research*, 92, 291-303. <https://doi.org/10.1016/j.fcr.2005.01.022>
- Taiz, L., & Zeiger, E. (2009). *Fisiologia vegetal* (4th ed.). Porto Alegre: Artmed.
- Torabi, S., & Niknam, V. (2011). Effects of iso-osmotic concentrations of NaCl and mannitol on some metabolic activity in calluses of two *Salicornia* species. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, 47, 734-742. <https://doi.org/10.1007/s11627-011-9371-6>
- Tuteja, N. (2007). Mechanisms of high salinity tolerance in plants. *Methods in Enzymology*, 428, 419-438. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(07\)28024-3](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(07)28024-3)
- Vanrensburg, L., Kruger, G. H. J., & Kruger, R. H. (1993). Proline accumulation the drought tolerance selection: its relationship to membrane integrity and chloroplast ultra structure in *Nicotiana tabacum* L. *Journal of Plant Physiology*, 141, 188-94. [https://doi.org/10.1016/S0176-1617\(11\)80758-3](https://doi.org/10.1016/S0176-1617(11)80758-3)
- Verbruggen, N., & Hermans, C. (2008). Proline accumulation in plants: A review. *Amino Acids*, 35, 753-759. <https://doi.org/10.1007/s00726-008-0061-6>
- Verma, D., Ansari, M. W., Agrawal, G. K., Rakwal, R., Shukla, A., & Tuteja, N. (2013). *In vitro* selection and field responses of somaclonal variant plants of rice cv PR113 for drought tolerance. *Plant Signaling Behavior*, 8(4). <https://doi.org/10.4161/psb.23519>
- Verslues, P. E., Agarwal, M., Katiyar-Agarwal, S., Zhu, J., & Zhu, J. K. (2006). Methods and concepts in quantifying resistance to drought, salt and freezing, abiotic stresses that affect plant water status. *The Plant Journal*, 45, 523-539. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3113.2005.02593.x>
- Wang, Z., & Huang, B. (2004). Physiological recovery of Kentucky bluegrass from simultaneous drought and heat stress. *Crop Science*, 44, 1729-1736. <https://doi.org/10.2135/cropsci2004.1729>
- Wani, S. H., Sofi, P. A., Gosal, S. S., & Singh, N. B. (2010). *In vitro* screening of rice (*Oryza sativa* L.) callus for drought tolerance. *Communications in Biometry and Crop Science*, 5(2), 108-115.
- Yordanov, I., Velikova, V., & Tsonev, T. (2003). Plant responses to drought and stress tolerance. *Bulgarian Journal of Plant Physiology*, 187-206.

6. ARTIGO 3

ALTERAÇÕES BIOQUÍMICAS, FISIOLÓGICAS E DE CRESCIMENTO EM RESPOSTA À SALINIDADE *IN VITRO* EM CANA-DE-AÇÚCAR

Bioscience Journal

RESUMO

Os estresses abióticos em plantas têm despertado grande interesse da pesquisa, que tem buscado incessantemente por cultivares mais produtivas sob condições desfavoráveis de cultivo. A deficiência hídrica e a salinidade do solo são os mais estudados, em razão de seu forte impacto sobre o crescimento e a produtividade das plantas. O objetivo deste estudo foi avaliar acessos de diferentes espécies de cana-de-açúcar (*Saccharum robustum*, *Saccharum* spp., *S. officinarum*), quanto a tolerância à salinidade *in vitro*, a partir de alterações nos parâmetros fisiológicos, anatômicos, bioquímicos e biométricos, para auxiliar em futuros programas de melhoramento. Para tanto foram utilizadas brotações, cultivadas em meio Murashige e Skoog, suplementado com 2% de sacarose e 4 g.L⁻¹ de Phytigel, na presença de cinco concentrações 0, 50, 100, 150, 200 mM de NaCl. Comprimento das brotações e da raiz, número de brotações e de raízes, peso fresco, peso seco, teor de prolina nas folhas, conteúdo de clorofila total e alterações morfológicas dos tecidos foliares foram analisados. O crescimento *in vitro* dos acessos *Saccharum robustum*, *Saccharum* spp. e *Saccharum officinarum* é afetado pela salinidade induzida por NaCl. O acúmulo de prolina e decréscimo de clorofila é intensificado em *Saccharum* spp., além de mudança na anatomia de células, caracterizando-se como mais sensível ao sal.

Palavras-chave: clorofila, histologia, prolina, *Saccharum officinarum*, *Saccharum robustum*, *Saccharum* spp.

ABSTRACT

BIOCHEMICAL, PHYSIOLOGICAL AND GROWTH CHANGES IN RESPONSE TO *IN VITRO* SALINITY IN SUGARCANE

Abiotic stresses in plants have aroused great research interest, unceasingly seeking for more productive cultivars under unfavorable cultivation conditions. Water deficiency and soil salinity are the most studied aspects, due to their strong impact on the growth and productivity of plants. The objective of this study was to evaluate accessions of different sugarcane species (*Saccharum* spp., *S. robustum*, *S. officinarum*) regarding tolerance to *in vitro* salinity, from changes in physiological, anatomical, biochemical and biometric parameters, to assist in breeding programs. To this end, shoots were used, grown on Murashige and Skoog medium, supplemented with 2% of sucrose and 4 g.L⁻¹ Phytagel, in the presence of five concentrations 0, 50, 100, 150, 200 mM NaCl. Shoots length, roots length, shoots number, roots number, fresh weight, dry weight, proline content in leaves, total chlorophyll content, and morphological changes to the leaf tissue were analyzed. The *in vitro* growth of accessions *Saccharum robustum*, *Saccharum* spp. and *Saccharum officinarum* are affected by salinity induced by NaCl. The proline accumulation and chlorophyll decrease are intensified in *Saccharum* spp., in addition to changes in cell's anatomy, characterized as more sensitive to salt.

Key-words: Chlorophyll, Histology, Proline, *Saccharum officinarum*, *Saccharum robustum*, *Saccharum* spp.

6.1. Introdução

A cana-de-açúcar é uma planta que pertence ao gênero *Saccharum* e à família *Poaceae*, de metabolismo fotossintético C₄, originária do sudeste asiático (CASU et al., 2004) que é bastante suscetível à salinidade (AKHTAR et al., 2003; PLAUT et al., 2000). Wahid e Ghazanfar (2006) afirmam que a tolerância ao sal varia entre as variedades de cana-de-açúcar.

A resposta das plantas às condições de salinidade está relacionada com o tempo de exposição e grau de tolerância ao sal, que depende da concentração e da natureza dos sais dissolvidos, de fatores climáticos, da absorção de água e nutrição vegetal (VASANTHA; GOMATHI, 2012). As diferentes respostas obtidas de variedades de cana-de-açúcar quanto à tolerância à salinidade estão relacionadas aos mecanismos por elas desenvolvidos para minimizar o efeito osmótico dos sais no solo, o que limita a absorção de água e a menor vulnerabilidade a concentrações tóxicas de íons como Na⁺ e Cl⁻ (MUNNS; TESTER, 2008).

Geralmente, o primeiro efeito da salinidade no desenvolvimento das plantas é a redução no crescimento, provocado pelo decréscimo no potencial hídrico da solução do solo a nível abaixo do necessário para que ocorra a absorção de água pelas células das raízes, impedindo, por conseguinte, a expansão celular, visto que o potencial de pressão da célula tende a se igualar com o do solo (TAIZ; ZEIGER, 2009).

Vários mecanismos de proteção são ativados nas plantas em função das condições adversas de crescimento, dentre eles o ajuste osmótico por meio do aumento da concentração de osmólitos, constituindo-se um dos mecanismos fisiológicos mais eficazes de proteção e para manutenção da turgescência celular (MARIJUAN; BOSCH, 2013).

Algumas outras estratégias fisiológicas e bioquímicas para tolerar danos causados pelo estresse salino incluem acúmulo ou exclusão seletiva de íons, mudanças nas vias fotossintéticas, degradação do pigmento fotossintético, diminuição da condutância estomática, alterações nas estruturas de membrana, indução de hormônios e enzimas antioxidantes (ASHRAF; HARRIS, 2004; MUDGAL et al., 2010; NAWAZ et al., 2010; PARIDA; DAS, 2005). Esses aspectos já foram estudados em banana (WILLADINO et al., 2017), batata (TEIXEIRA; PEREIRA, 2007), arroz (CHA-UM et al., 2007; REDDY et al., 2017), milho (HU et al., 2007), e em culturas de cana-de-açúcar sob estresse *in vitro* (AVINASH et al., 2012; CHA-UM; KIRDMANEE, 2009;

ERRABII et al., 2007; PATADE et al., 2012; PATADE et al., 2008; POONSAWAT et al., 2015). No entanto, estudos mais detalhados dessas alterações provocadas pelos estresses, associados a uma observação a nível anatômico das células, ainda são escassos.

Além de se caracterizar como um grave problema ambiental, a elevada concentração de sais no solo causa perdas consideráveis para agricultura mundial, seja em cultivos já estabelecidos ou por inviabilizar a exploração de novas áreas agricultáveis (MUNNS et al., 2006). Dessa forma, os estresses abióticos em plantas têm despertado grande interesse da pesquisa, que tem buscado incessantemente por cultivares mais produtivas sob condições desfavoráveis de cultivo (FILIPPOU et al., 2014).

A cultura *in vitro*, além de fornecer técnicas de estudo em ambiente controlado, reduz o custo inicial de pesquisas, sendo, portanto, uma proposta para acelerar o processo de seleção de acessos tolerantes a tais condições (ANDRADE, 2002). Diante disto, o objetivo deste estudo foi avaliar acessos de diferentes espécies de cana-de-açúcar (*Saccharum* spp., *S. robustum*, *S. officinarum*) quanto à tolerância ao estresse salino durante cultivo *in vitro*, a partir de alterações fisiológicas, anatômicas, bioquímicas e biométricas, para auxiliar em programas de melhoramento.

6.2. Material e Métodos

Os experimentos foram conduzidos no Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais, no Laboratório de Ecofisiologia Vegetal da Embrapa Tabuleiros Costeiros, em Aracaju, Sergipe, Brasil, e no Laboratório de Anatomia Vegetal da Universidade Federal de Lavras, em Minas Gerais, Brasil.

6.2.1. Material vegetal

Como material vegetal, foram utilizadas brotações dos acessos: Q44830 - *Saccharum officinarum*; Q45251 - *Saccharum robustum*; Q45416 - *Saccharum* spp., previamente estabelecidos *in vitro*, provenientes de Queensland (Austrália), fornecido pelo National Center for Genetic Resources Preservation/ ARS / USDA, Fort Collins, CO, EUA, que fazem parte do Banco Ativo de Germoplasma de Cana-de-Açúcar da Embrapa Tabuleiros Costeiros, Aracaju, Sergipe, Brasil.

6.2.2. Condições de crescimento e tratamento de estresse

A cada 30 dias, as culturas foram multiplicadas em meio asséptico, em tubos de ensaio contendo 20 mL de meio de multiplicação (MM) constituído por sais do MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962), suplementado com 2% de sacarose, 0,2 mg.L⁻¹ BAP (6-benzilaminopurina) + 0,1 mg.L⁻¹ de cinetina, gelificado com 4 g.L⁻¹ de Phytigel e pH ajustado para 5,8.

O meio foi autoclavado a 121°C durante 20 minutos. As culturas foram mantidas sob condições de temperatura ambiente (25 ± 2°C), fotoperíodo de 16 horas sob intensidade luminosa de 60 µmolm⁻²s⁻¹.

Após três subcultivos, brotações com aproximadamente 3 cm de comprimento foram transferidas para tubos de ensaio com 20 mL de meio de cultura MS, suplementado com 2% de sacarose e gelificado com 4 g.L⁻¹ de Phytigel, na presença de cinco concentrações de NaCl: 0, 50, 100, 150 e 200 mM.

Os tubos foram selados com filme plástico de polietileno e as culturas foram transferidas para a sala de crescimento sob as mesmas condições descritas anteriormente.

6.2.3. Caracteres biométricos, fisiológicos, bioquímicos

6.2.3.1. Avaliação de crescimento

Após 60 dias as variáveis comprimento da parte aérea e das raízes (cm), massa fresca (Mf) e seca (Ms), número de brotações e de raízes foram avaliadas segundo a metodologia utilizada por Oliveira et al. (2018a).

6.2.3.2. Determinação do teor de prolina

O conteúdo de prolina das folhas foi determinado aos 20, 40 e 60 dias, de acordo com a metodologia de Bates et al. (1973): um grama de tecido foliar foi macerado em um almofariz com 10 mL de solução de ácido 5-sulfosalicílico a 3%. As folhas maceradas foram transferidas para tubos e centrifugadas a 5.000 rpm por 20 minutos. Foi feita a reação de 1 mL da solução sobrenadante com um volume igual de ácido acético glacial e reagente de Ninidrina (1,25 mg de Ninidrina em 30 mL de ácido acético glacial e 20 mL de H_3PO_4 a 6 M) e incubação a 100°C durante 1 hora. A reação foi paralisada colocando-a num banho de gelo. A reação foi misturada com 2 mL de tolueno, agitada e deixada de lado até à separação das fases. A leitura da fase colorida foi realizada em espectrofotômetro de 520 nm, utilizando L-prolina como padrão, e tolueno como branco.

6.2.3.3. Estimativa do conteúdo de clorofila

O conteúdo de clorofila total foi quantificado aos 20, 40 e 60 dias, de acordo com o método de Arnon (1949): 100 mg de folhas foram macerados em almofariz com uma pequena porção de carbonato de magnésio na ausência de luz, e após formar uma pasta, adicionou-se 10 mL de acetona 80%. O macerado foi transferido para frascos cobertos com papel alumínio, e posteriormente centrifugados numa rotação de 8000 rpm durante 20 minutos a 4°C. As concentrações de clorofila *a* e clorofila *b* foram medidas em espectrofotômetro de UV-visível a 645 nm e 663 nm. Uma solução de 80% acetona foi utilizada como branco.

6.2.3.4. Análises histológicas

Após 60 dias de cultivo *in vitro*, amostras de tecidos foliares provenientes dos diferentes tratamentos e acessos foram fixadas em FAA 70% (Formaldeído, ácido acético glacial, etanol 70%) por 72 horas, desidratados em série crescente etílica (80%, 90% e 100%) em intervalos de 1 hora, infiltradas em solução de infiltração (kit de historesina Leica Microsystems, Heidelberg, Alemanha) e polimerizadas em histolmodes. A microtomia foi realizada utilizando micrótomo semiautomático (modelo YD335) com cortes de espessura 8 µm que foram posteriormente corados com azul de toluidina pH 4.8 e observados em microscópio óptico (Nikon Eclipse E100 acoplado à câmera Infinity 1) onde foram realizadas as fotomicrografias (OLIVEIRA et al., 2018b).

6.2.4. Delineamentos experimentais e análises estatísticas

Utilizou-se o delineamento inteiramente casualizado, em esquema fatorial 3 acessos x 5 concentrações de NaCl com cinco repetições, contendo uma brotação com aproximadamente 3 cm de comprimento por tubo por unidade experimental.

Para comparar os teores de prolina e clorofila, utilizou-se o delineamento inteiramente casualizado em parcelas subdivididas no tempo, com os fatores acessos e NaCl utilizados na parcela e tempo nas subparcelas, com três repetições.

Os dados das variáveis foram submetidos à análise de variância. Para os níveis de NaCl, utilizou-se a análise de regressão e para tempo e acessos foi utilizado o teste de Tukey com 5% de significância. Foi utilizado o programa estatístico SAS-9.4 (SAS INSTITUTE, 2013) para todas as análises.

6.3. Resultados e Discussão

6.3.1. Efeito da salinidade em parâmetros biométricos

O crescimento *in vitro* de explantes de cana-de-açúcar foi fortemente afetado pela presença de NaCl. Houve interação significativa entre os acessos e a concentração de NaCl para: comprimento de parte aérea, comprimento de raízes, número de raízes e número de brotações.

Para comprimento de parte aérea, observou-se uma resposta linear, com redução significativa em *Saccharum robustum* (Q45251), *Saccharum* spp. (Q45416) e *S. officinarum* (Q44830) com o aumento de NaCl (Figura 1A). *Saccharum robustum* (Q45251) foi o acesso que apresentou maior crescimento médio em todas as concentrações de NaCl (Tabela 1). A inibição no alongamento da parte aérea é resultado de dois processos: redução da absorção de água resultante do déficit hídrico causado pela salinidade e elevada concentração de íons no fluxo transpiratório, ocasionando transformações nas folhas (GORDIN et al., 2012; TAIZ; ZEIGER, 2009).

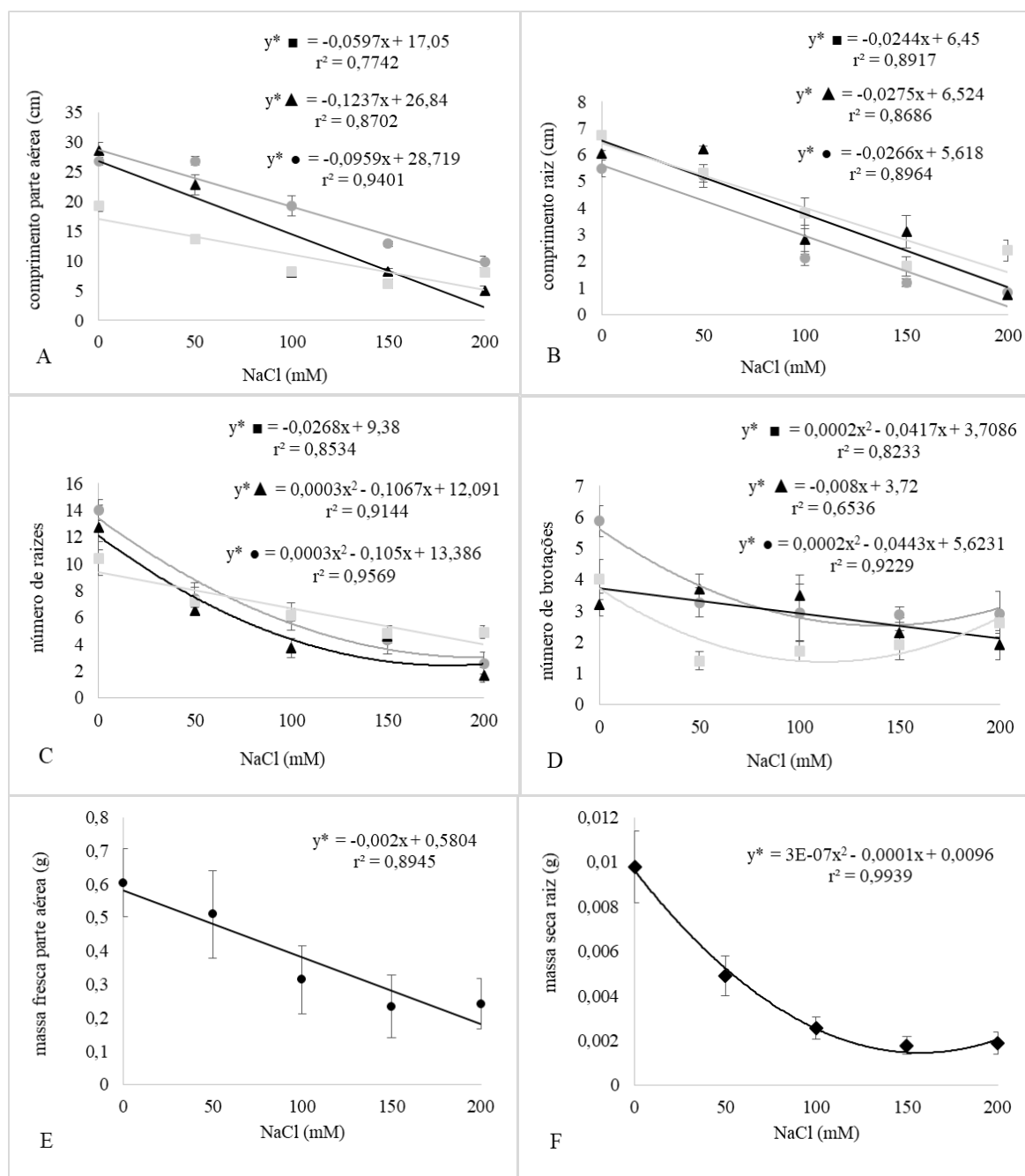


Figura 1: Efeito da salinidade *in vitro* no comprimento de brotações (A), comprimento de raízes (B), número de raízes (C), número de brotações (D), massa fresca de brotações (E) e massa seca de raízes (F) de acessos de cana-de-açúcar aos 60 dias de cultivo *in vitro* em diferentes concentrações salinas (0; 50; 100; 150; 200 mM NaCl). ● *S. robustum* (Q45251); ▲ *Saccharum* spp. (Q45416); ■ *S. officinarum* (Q44830).

Houve resposta linear negativa para o número de raízes para *S. officinarum* (Q44830) e quadrática para *S. robustum* (Q45251) e *Saccharum* spp. (Q45416). A menor indução de raízes ocorreu na presença de 177,83 mM de NaCl em *Saccharum* spp. e 175 mM em *S. robustum*, com médias estimadas de 2,6 e 4,19 raízes por planta, respectivamente (Figura 1C). *S. robustum* (Q45251) se destacou na maior produção de raízes (14,0) na ausência de sal. Não houve diferença entre os acessos nos tratamentos de 50 a 150 mM de NaCl, somente no tratamento mais severo de sal, em que *S. officinarum* (Q44830) emitiu mais raízes (Tabela 1). Munns et al. (2002) afirmam que a redução de raízes em estresse salino é consequência exclusiva de alterações nas relações hídricas da célula.

Considerando o comprimento das raízes, nos três acessos houve redução linear à medida que o meio ficou mais salino (Figura 1B). O excesso de sais na zona radicular das plantas pode ocasionar redução no comprimento e número de raízes, exercendo efeitos nocivos no desenvolvimento da planta (RHOADES et al., 2000). Para os autores, a hipótese que melhor explica esse fato é que o efeito prejudicial dos altos níveis de sal, no meio externo às raízes, acarreta diminuição na capacidade de absorção de água e nutrientes pela planta, diminuindo, consequentemente, a quantidade de nutrientes disponíveis para serem translocados aos demais órgãos, ocasionando menor crescimento e desenvolvimento do vegetal.

A presença de NaCl no meio de cultura promoveu diferentes respostas na emissão de brotações nos acessos estudados. Em *S. officinarum* (Q44830) a menor produção de brotos (1,53) foi alcançada na presença de 104,25 mM NaCl e para *S. robustum* (Q45251) de 110,75 mM com média de 3,16 brotações. Por outro lado, a redução de brotos foi linear em *Saccharum* spp. (Q45416) (Figura 1 D). Na ausência de sal, *Saccharum robustum* (Q45251) apresentou maior média (5,86). Nos dois tratamentos salinos mais severos não houve diferença estatística entre os três acessos (Tabela 1). Santos et al. (2009) destacam que a taxa de crescimento de plantas sob estresse salino é menos acentuada em tecidos mais jovens, como brotos e gemas, pois o aumento do potencial osmótico afeta a absorção de água e nutrientes no meio de cultura, comprometendo os pontos de crescimento e expansão celular.

Tabela 1: Comprimento da parte aérea, comprimento da raiz, número de raízes e número de brotações (média \pm erro padrão da média) de acessos de cana-de-açúcar aos 60 dias de cultivo *in vitro* em diferentes concentrações salinas.

Acessos	NaCl (mM)				
	0	50	100	150	200
Comprimento da parte aérea (cm)					
<i>S. robustum</i> (Q45251)	26,80 \pm 0,64 a ¹	26,87 \pm 0,76 a	19,30 \pm 1,66 a	12,87 \pm 0,39 a	9,83 \pm 1,01a
<i>Saccharum</i> spp. (Q45416)	28,50 \pm 1,54 a	22,80 \pm 1,68 b	8,00 \pm 0,50 b	8,15 \pm 0,56 b	4,90 \pm 0,82 b
<i>S. officinarum</i> (Q44830)	19,25 \pm 0,87 b	13,70 \pm 0,73 c	8,20 \pm 0,82 b	6,15 \pm 0,77 b	8,10 \pm 0,49 ab
CV (%)	14,74				
Comprimento da raiz (cm)					
<i>S. robustum</i> (Q45251)	5,47 \pm 0,31 b	5,20 \pm 0,43 a	2,10 \pm 0,26 b	1,19 \pm 0,15 b	0,81 \pm 0,22 b
<i>Saccharum</i> spp. (Q45416)	6,05 \pm 0,12 ab	6,20 \pm 0,12 a	2,80 \pm 0,55 ab	3,10 \pm 0,60 a	0,73 \pm 0,12 b
<i>S. officinarum</i> (Q44830)	6,75 \pm 0,16 a	5,30 \pm 0,34 a	3,80 \pm 0,58 a	1,80 \pm 0,35 b	2,40 \pm 0,39 a
CV (%)	22,25				
Número de raízes					
<i>S. robustum</i> (Q45251)	14,00 \pm 0,78 a	7,40 \pm 1,18 a	6,06 \pm 1,01 a	4,33 \pm 1,07 a	2,58 \pm 0,84 ab
<i>Saccharum</i> spp. (Q45416)	12,70 \pm 1,69 ab	6,50 \pm 0,27 a	3,70 \pm 0,72 a	4,60 \pm 0,48 a	1,70 \pm 0,54 b
<i>S. officinarum</i> (Q44830)	10,40 \pm 1,26 b	7,20 \pm 1,05 a	6,20 \pm 0,46 a	4,80 \pm 0,34 a	4,90 \pm 0,46 a
CV (%)	15,25				
Número de brotações					
<i>S. robustum</i> (Q45251)	5,87 \pm 0,49 a	3,27 \pm 0,46 a	2,93 \pm 0,92 ab	2,87 \pm 0,25 a	2,90 \pm 0,73 a
<i>Saccharum</i> spp. (Q45416)	3,20 \pm 0,37 b	3,70 \pm 0,46 a	3,50 \pm 0,63 a	2,30 \pm 0,46 a	1,90 \pm 0,46 a
<i>S. officinarum</i> (Q44830)	4,00 \pm 0,65 b	1,40 \pm 0,29 b	1,70 \pm 0,34 b	1,90 \pm 0,46 a	2,60 \pm 0,33 a
CV (%)	16,92				

¹Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey a 0,05%.

Para a massa seca da parte aérea e massa fresca das raízes, observou-se efeito significativo apenas no acesso; para a massa seca das raízes, apenas o efeito do tratamento salino; e para a massa fresca da parte aérea, efeito do acesso e tratamento salino.

De um modo geral, houve redução da biomassa à medida que o tratamento salino foi mais concentrado (Figura 1E, Figura 2). Para raiz, o comportamento foi quadrático, com menor massa em 150 mM de NaCl. Considerando os acessos, *Saccharum robustum* apresentou maior biomassa aos 60 dias (Tabela 2).



Figura 2: Brotações de cana-de-açúcar aos 40 dias de cultivo *in vitro* em diferentes concentrações salinas induzidas por NaCl. **A** - *S. robustum* (Q45251), **B** - *Saccharum* spp. (Q45416), **C** - *S. officinarum* (Q44830).

Tabela 2: Biomassa de acessos de cana-de-açúcar (média \pm erro padrão da média) aos 60 dias de cultivo *in vitro* submetidos ao estresse salino *in vitro*. Mf – massa fresca; Ms – massa seca

Acessos	Mf parte aérea	Ms parte aérea	Mf raiz	Ms raiz
<i>S. robustum</i> (Q45251)	0,71 \pm 0,07 a ¹	0,11 \pm 0,03 a	0,67 \pm 0,09 a	0,004 \pm 0,00 a
<i>Saccharum</i> spp. (Q45416)	0,25 \pm 0,06 b	0,04 \pm 0,01 b	0,06 \pm 0,02 b	0,0045 \pm 0,00 a
<i>S. officinarum</i> (Q44830)	0,19 \pm 0,04 b	0,03 \pm 0,01 b	0,04 \pm 0,01 b	0,004 \pm 0,00 a
CV (%)	9,63	5,21	11,64	0,26

¹Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey a 0,05%.

Estudos de Patade et al. (2011) mostraram que plantas de cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum* L. cv. Co 86032) cultivadas com NaCl 150 mM durante 15 dias apresentaram uma redução significativa na massa seca, área e comprimento das folhas, em comparação ao controle, devido ao acúmulo de íons salinos tóxicos, que alteraram a taxa de crescimento, possivelmente para ajudar a planta a reduzir o uso de água e, portanto, um mecanismo para evitar o estresse.

As variáveis massa fresca da parte aérea, massa seca de parte aérea, massa fresca da raiz e massa seca da raiz foram influenciadas significativamente pelos níveis de sal em um estudo de Simões et al. (2016). Houve reduções lineares nos níveis de salinidade, chegando a reduções relativas de 48, 29, 35 e 77%, respectivamente, ao tratamento 8 dS m⁻¹ (80 mM) quando comparado ao controle, mostrando maior sensibilidade da massa seca das raízes às variações de salinidade e menor sensibilidade da massa seca da parte aérea, corroborando o resultado deste estudo.

Além disso, o estresse salino também reduziu significativamente o crescimento da parte aérea e o comprimento da raiz em variedades (CoC671 e CoC24) de *Saccharum officinarum* com os níveis crescentes de salinidade, principalmente em 200 mM de NaCl (ANITHA et al., 2015), demonstrando que estresse causa inibição do crescimento da parte apical da planta e desequilíbrio hormonal endógeno (YOUNIS et al., 2010).

Em cultivo de cana-de-açúcar *in vitro* (cv. C-1051-73) implementado em biorreatores, 200 mM NaCl reduziu a taxa de multiplicação de brotos em 90,4% da obtida no tratamento controle sem NaCl, enquanto a massa fresca diminuiu 83,9% (GOMÉZ et al., 2017). Redução da massa fresca, altura da parte aérea, comprimento da raiz e área foliar também foi relatado por Cha-Um e Kirdmanee (2009) em *S. officinarum* sob estresse salino (-1,2 Mpa).

6.3.2. Efeito da salinidade no teor de prolina

Houve um efeito significativo ($p < 0,5$) na interação tripla entre os fatores tempo, acesso e tratamento salino no teor de prolina.

Em *S. robustum* (Q45251) e *Saccharum* spp. (Q45416) houve um aumento linear significativo no conteúdo de prolina à medida que o meio se tornou mais salino aos 20, 40 e 60 dias. Em *S. officinarum* (Q44830), houve uma resposta linear com um aumento significativo aos 20 dias; quadrático aos 40 dias, com maior produção de prolina ($15,03 \mu\text{mol g}^{-1} \text{Mf}$) em 98 mM NaCl; e aos 60 dias esta produção não foi significativa (Figura 3).

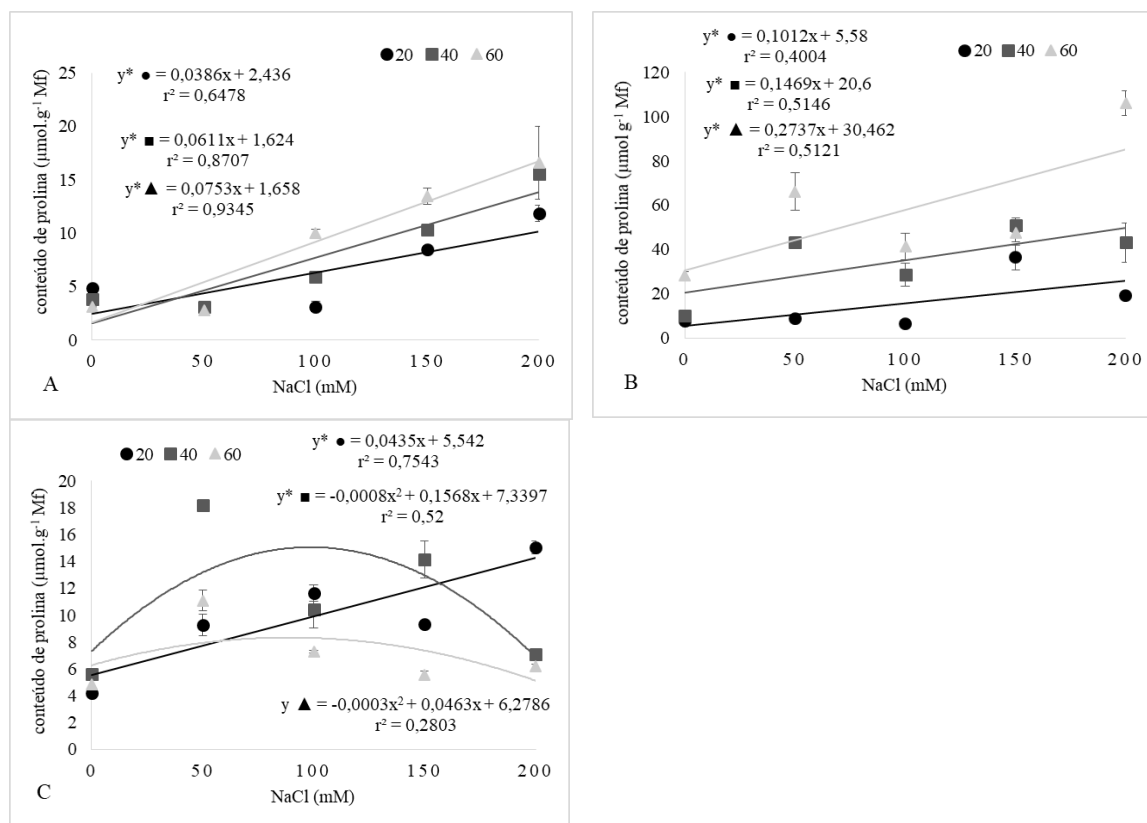


Figura 3: Efeito da salinidade no conteúdo de Prolina em **A** - *S. robustum* (Q45251), **B** - *Saccharum* spp.(Q45416), **C** - *S. officinarum* (Q44830) aos 20, 40 e 60 dias de cultivo *in vitro* em diferentes concentrações salinas (0; 50; 100; 150; 200 mM de NaCl).

Maiores médias foram alcançadas no acesso Q45416 (*Saccharum* spp.) aos 60 dias de cultivo em meio salino (Tabela 3). Esse acesso também se destacou nos outros tempos de avaliação, o que demonstra tentativas de osmorregulação natural, já que o acúmulo de solutos, como a prolina, possibilita que a planta desenvolva reações que permitam a continuidade dos processos fisiológicos (MARIJUAN; BOSCH, 2013). Esse acúmulo possibilitou a sobrevivência e manutenção do crescimento das plantas, embora menor, quando comparado ao tratamento sem NaCl.

Considerando o acesso Q45251 (*Saccharum robustum*), não houve diferença estatística entre os teores de prolina nos tempos avaliados em todos os tratamentos, demonstrando que o conteúdo deste aminoácido não aumentou em função do tempo de estresse, comprovando a tolerância em relação aos níveis de sal estudados.

Em *S. officinarum* não houve diferença na produção do aminoácido nos três tempos avaliados para 0, 100 e 150 mM de NaCl. Em 50 mM de NaCl, houve maior produção aos 40 dias, e 200 mM NaCl, maior produção aos 20 dias.

Tabela 3: Teor de prolina livre ($\mu\text{mol.g}^{-1}$ de Mf) em acessos de cana-de-açúcar (média \pm erro padrão da média), aos 20, 40 e 60 dias de cultivo *in vitro* sob estresse salino.

Acessos	Dias		
	20	40	60
0 mM NaCl			
<i>S. robustum</i> (Q45251)	4,87 \pm 0,00 aA ¹	3,85 \pm 0,30 aA	3,10 \pm 0,03 aB
<i>Saccharum</i> spp. (Q45416)	7,89 \pm 0,21 bA	10,22 \pm 0,83 bA	28,39 \pm 1,72 aA
<i>S. officinarum</i> (Q44830)	4,19 \pm 0,32 aA	5,61 \pm 0,07 aA	4,87 \pm 0,70 aB
50 mM NaCl			
<i>S. robustum</i> (Q45251)	3,14 \pm 0,14 aA	3,09 \pm 0,22 aC	2,79 \pm 0,22 aB
<i>Saccharum</i> spp. (Q45416)	8,64 \pm 0,29 cA	43,43 \pm 2,31 bA	66,04 \pm 8,43 aA
<i>S. officinarum</i> (Q44830)	9,28 \pm 0,80 bA	18,20 \pm 0,36 aB	11,10 \pm 0,77 abB
100 mM NaCl			
<i>S. robustum</i> (Q45251)	3,15 \pm 0,50 aA	5,91 \pm 0,07 aB	10,02 \pm 0,38 aB
<i>Saccharum</i> spp. (Q45416)	6,28 \pm 0,72 cA	28,63 \pm 5,37 bA	41,22 \pm 5,95 aA
<i>S. officinarum</i> (Q44830)	11,63 \pm 0,62 aA	10,42 \pm 1,40 aB	7,28 \pm 0,11 aB
150 mM NaCl			
<i>S. robustum</i> (Q45251)	8,48 \pm 0,16 aB	10,30 \pm 0,10 aB	13,44 \pm 0,75 aB
<i>Saccharum</i> spp. (Q45416)	36,35 \pm 5,59 bA	51,02 \pm 3,32 aA	47,33 \pm 3,99 aA
<i>S. officinarum</i> (Q44830)	9,33 \pm 0,14 aB	14,16 \pm 1,40 aB	5,57 \pm 0,28 aB
200 mM NaCl			
<i>S. robustum</i> (Q45251)	11,86 \pm 0,74 aA	15,52 \pm 0,41 aB	16,61 \pm 3,42 aB
<i>Saccharum</i> spp. (Q45416)	19,23 \pm 1,2 cA	43,15 \pm 8,94 bA	106,16 \pm 5,6 aA
<i>S. officinarum</i> (Q44830)	15,05 \pm 0,46 aA	7,08 \pm 0,30 abB	6,19 \pm 0,16 bC

¹Médias seguidas de mesma letra minúsculas na linha e maiúsculas na coluna não diferem pelo teste de Tukey a 0,05%.

Em resposta ao estresse, as plantas podem sintetizar solutos compatíveis no citosol. Esses compostos de baixo peso molecular, que pouco intervêm nas reações bioquímicas habituais da planta, atuam no ajuste osmótico, proteção de macromoléculas celulares, estocagem de nutrientes, manutenção do pH celular (ASHRAF; HARRIS 2004), e a partir de sua função osmoprotetora, protegem as plantas de bioprodutos tóxicos produzidos como efeitos secundários durante o estresse iônico (TAIZ; ZEIGER, 2009).

O aminoácido prolina é o soluto mais estudado devido a sua sensibilidade à resposta a condições de estresse, como temperaturas extremas, seca, salinidade e metais pesados, com possibilidade de aumento em até 100 vezes em comparação com plantas normais, fornecendo, dessa forma, um importante parâmetro para a seleção de plantas resistentes (VERBRUGGEN; HERMANS, 2008). Nesta pesquisa, os níveis de prolina aumentaram até cinco vezes nas plantas tratadas com NCI em relação ao controle.

Munns e Tester (2008) afirmam que a prolina tem dois papéis funcionais: altas concentrações indicam ajuste osmótico e baixas concentrações indicam efeito protetor. No ajuste osmótico, os osmólitos facilitam a retenção de água no citoplasma e permitem o sequestro de Na^+ pelo vacúolo ou apoplasto (ASHRAF; HARRIS, 2004).

Na cana-de-açúcar, há muitos relatos sobre o acúmulo de prolina em calos, plântulas e plantas adultas quando expostos ao aumento da concentração do estresse salino (CHA-UM; KIRDMANEE, 2009; ERRABI et al., 2007; GANDONOU et al., 2006; PATADE et al., 2008). Gandonou et al. (2005) estudando variedades de cana-de-açúcar em condições de estresse salino *in vitro*, observaram que tanto a variedade sensível CP65-357 quanto a variedade resistente NCo310 se comportaram de forma semelhante, acumulando maiores quantidades de prolina nos

tratamentos salinos mais severos estudados (102 mM). Granja et al. (2018) avaliando a resposta de duas variedades comerciais de cana-de-açúcar, RB931011 e RB872552, expostas ao estresse salino *in vitro* por NaCl (56 mM e 112 mM), concluíram que o teor de prolina aumentou apenas nas plantas submetidas ao tratamento com 112 mM de NaCl, conferindo às variedades de cana uma maior proteção contra o estresse salino. Esses resultados reforçam os resultados encontrados no presente estudo, em relação ao aumento de prolina em plantas submetidas a níveis crescentes de NaCl.

Resultados similares quanto ao aumento do aminoácido prolina em função do aumento do estresse foram também relatados para variedades de *Saccharum officinarum* submetidas à outros estresses como o hídrico induzidos por PEG (ABBAS et al., 2014), e à radiação UV (AVINASH et al., 2012).

6.3.3. Efeito da salinidade no conteúdo de clorofila total

Aos 20 dias de cultivo *in vitro*, o teor de clorofila de *Saccharum* spp. permaneceu estável com o aumento do estresse salino, ou seja, não houve aumento significativo, demonstrando que, naquele momento, a salinidade não influenciou significativamente os processos metabólicos deste acesso. Em *S. robustum* (Q45251), a menor produção de clorofila ($0,92 \text{ mg.g}^{-1} \text{ Mf}$) ocorreu em 115 mM NaCl aos 20 dias. Em *S. officinarum* (Q44830), a diminuição da produção foi linear para este tempo de avaliação. Aos 40 e 60 dias de cultivo *in vitro*, o comportamento dos três acessos foi semelhante, com diminuição linear significativa da produção de pigmento fotossintético com o aumento da salinidade (Figura 4).

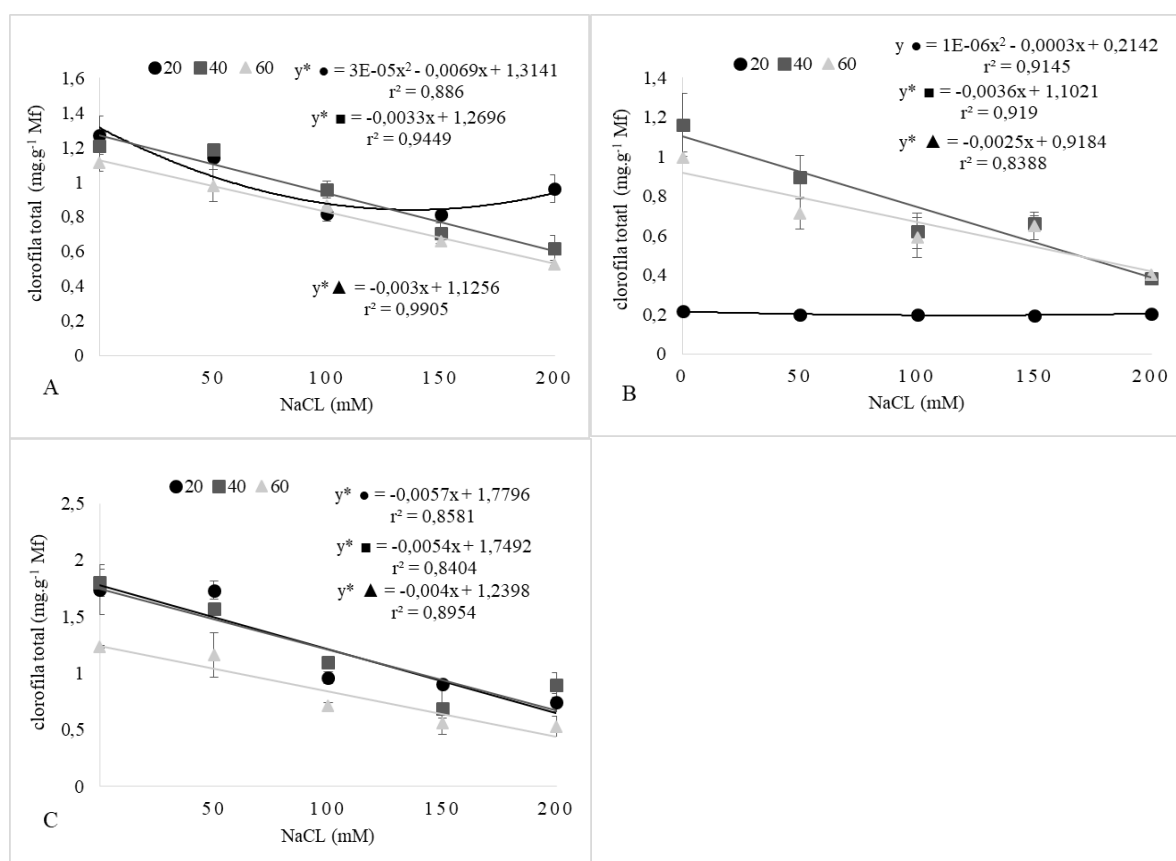


Figura 4: Efeito da salinidade no conteúdo de clorofila total em **A** - *S. robustum* (Q45251), **B** - *Saccharum* spp. (Q45416), **C** - *S. officinarum* (Q44830) aos 20, 40 e 60 dias de cultivo *in vitro* em diferentes concentrações salinas (0; 50; 100; 150; 200 mM de NaCl).

Em relação a *S. robustum*, observou-se diferença estatística quanto ao tempo de cultivo *in vitro* somente a 200 mM de sal, em que o tratamento de 20 dias apresentou maior teor de clorofila total (Tabela 4). Quanto a *S. officinarum*, houve diferença apenas aos 60 dias em todos

os tratamentos estudados, e para *Saccharum* spp., o comportamento variou com o tempo, mas no geral, não houve diferença entre os 40 e 60 dias de avaliação.

Comparando-se os três acessos, *S. robustum* e *S. officinarum* apresentaram um comportamento bastante similar, com este último alcançando melhores médias quanto à menor degradação do pigmento fotossintético, mostrando-se como uma proteção mais eficaz contra o estresse salino. *Saccharum* spp. obteve médias inferiores.

Tabela 4: Conteúdo de clorofila total (mg.g⁻¹ de Mf) em acessos de cana-de-açúcar (média ± erro padrão da média), aos 20, 40 e 60 dias de cultivo *in vitro* sob estresse salino.

Acessos	Dias		
	20	40	60
0 mM NaCl			
<i>S. robustum</i> (Q45251)	1,27 ± 0,11 aB ¹	1,22 ± 0,05 aB	1,11 ± 0,05 aA
<i>Saccharum</i> spp. (Q45416)	0,21 ± 0,00 cC	1,61 ± 0,16 aA	0,99 ± 0,03 bA
<i>S. officinarum</i> (Q44830)	1,74 ± 0,22 aA	1,80 ± 0,12 aA	1,23 ± 0,01 bA
50 mM NaCl			
<i>S. robustum</i> (Q45251)	1,14 ± 0,07 aB	1,19 ± 0,02 aB	0,98 ± 0,09 aAB
<i>Saccharum</i> spp. (Q45416)	0,20 ± 0,00 bC	0,89 ± 0,11 aC	0,71 ± 0,08 aB
<i>S. officinarum</i> (Q44830)	1,73 ± 0,08 aA	1,57 ± 0,02 aA	1,16 ± 0,20 bA
100 mM NaCl			
<i>S. robustum</i> (Q45251)	0,82 ± 0,04 aA	0,96 ± 0,05 aA	0,87 ± 0,01 aA
<i>Saccharum</i> spp. (Q45416)	0,20 ± 0,00 bB	0,62 ± 0,09 aB	0,59 ± 0,10 aB
<i>S. officinarum</i> (Q44830)	0,96 ± 0,05 abA	1,10 ± 0,02 aA	0,71 ± 0,03 bAB
150 mM NaCl			
<i>S. robustum</i> (Q45251)	0,81 ± 0,03 aA	0,70 ± 0,06 aA	0,66 ± 0,03 aA
<i>Saccharum</i> spp. (Q45416)	0,19 ± 0,00 bB	0,66 ± 0,04 aA	0,65 ± 0,07 aA
<i>S. officinarum</i> (Q44830)	0,90 ± 0,03 aA	0,69 ± 0,23 abA	0,56 ± 0,05 bA
200 mM NaCl			
<i>S. robustum</i> (Q45251)	0,96 ± 0,08 aA	0,62 ± 0,07 bB	0,53 ± 0,01 bA
<i>Saccharum</i> spp. (Q45416)	0,20 ± 0,00 aB	0,38 ± 0,03 aB	0,40 ± 0,00 aA
<i>S. officinarum</i> (Q44830)	0,74 ± 0,08 abA	0,90 ± 0,11 aA	0,53 ± 0,09 bA

¹Médias seguidas de mesma letra minúsculas na linha e maiúsculas na coluna não diferem pelo teste de Tukey a 0,05%.

Resultados semelhantes foram observados em três acessos de cana-de-açúcar a 200 mM de sal durante sete dias, nos quais a clorofila foi degradada (POONSAWAT et al., 2015). O nível total de clorofila em CoM-265, tolerante a sal, cultivado sob 7-8 dS m⁻¹ (70 a 80 mM) durante cinco dias, diminuiu apenas 8,84% em comparação com o declínio de 30,50% em CoC-671, sensível ao sal, ou seja, a menor degradação do pigmento favoreceu melhores atividades fotossintéticas em condições salinas (SATBHAI; NAIK, 2014). Além disso, Pagariya et al. (2012) também relataram que a degradação da clorofila depende do tempo de exposição ao sal, mostrando que a cultivar de cana-de-açúcar Co62175 foi mais sensível no tratamento com sal a longo prazo (NaCl a 2% por 30 dias) do que a curto prazo.

Uma redução linear de conteúdo de clorofila total em 45% e 20% em CoC 671 (sensível) e CoC 24 (tolerante), respectivamente, com um aumento no nível de salinidade (200 mM) foi relatada por Anitha et al. (2015), demonstrando que a redução da clorofila decorrente do estresse está relacionada ao aumento da produção de radicais livres na célula. Esses radicais

livres causam peroxidação, desintegração e redução do conteúdo de clorofila em plantas sob condições estressantes. Outros resultados semelhantes com cana-de-açúcar também foram encontrados por Cha-um e Kirdmanee (2009) em *Saccharum officinarum* e por Christy et al. (2013) em outras duas cultivares tolerantes e resistentes.

6.3.4. Efeito da salinidade na anatomia foliar

Em relação à anatomia foliar, a cana-de-açúcar apresenta cutícula com tecido uniestratificado com células de paredes delgadas na epiderme em ambas as faces. A cutícula desempenha um papel importante para minimizar a perda de água e o aumento da resistência das plantas às alterações bióticas por meio da sinalização de possíveis estresses (WANG et al., 2011). Nos três acessos estudados, apesar de alterações na cutícula, não houve sua degradação.

As células buliformes estão presentes em formato de leque, em tamanhos diferentes, somente na face adaxial da epiderme e estão associadas às células incolores. São células motoras, altamente vacuolizadas, e em condições de salinidade perderam pressão de turgescência, causando o enrolamento das folhas no acesso Q45416 (*Saccharum* spp.). Nos outros dois acessos, essas células permaneceram túrgidas mesmo com o aumento da concentração de sal no meio (Figura 5).

O mesófilo, composto por parênquima paliádico e esponjoso, não foi danificado em todos os acessos estudados.

Os feixes vasculares são rodeados por uma camada adicional de células características de plantas de metabolismo C4, a bainha vascular parenquimática. O CO₂ é captado nestas células e ao aumentar em até dez vezes a sua concentração acaba evitando a perda de água (TAIZ; ZEIGER, 2009).

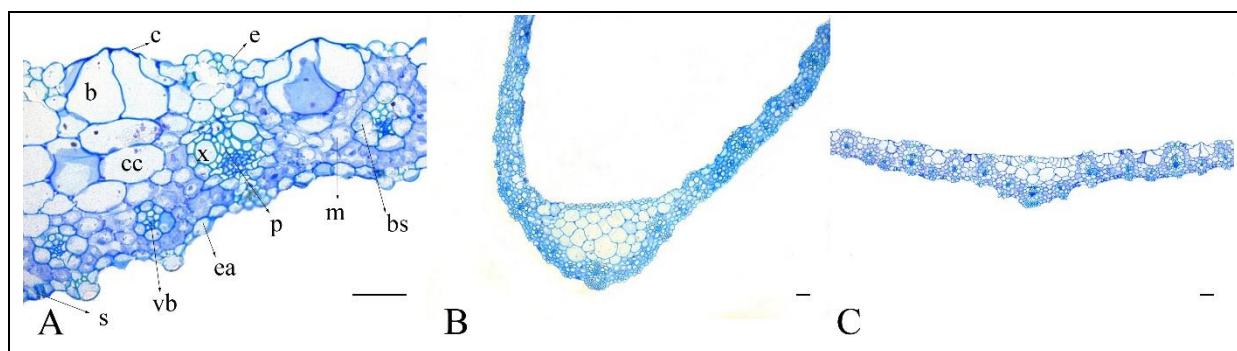


Figura 5: Seções transversais de folhas de cana-de-açúcar submetidas à 200 mM de NaCl aos 60 dias de cultivo *in vitro*. **A** - *S. robustum* (Q45251), **B** - *Saccharum* spp. (Q45416), **C** - *S. officinarum* (Q44830). Estruturas: **b** – células buliformes, **bs** – células da bainha do feixe vascular, **c** – cutícula, **cc** – células incolores, **e** – epiderme da face adaxial, **ea** – epiderme da face abaxial, **m** – mesófilo, **p** – floema, **s** – estômato, **vb** – feixes vasculares, **x** – xilema. Barras apresentam tamanho de 50 μm.

6.4. Conclusões

O crescimento *in vitro* dos acessos *Saccharum robustum*, *Saccharum* spp. e *Saccharum officinarum* é afetado pela salinidade induzida por NaCl.

O acúmulo de prolina e decréscimo no conteúdo de clorofila total é intensificado em *Saccharum* spp.

O decréscimo da turgescência ocasiona a diminuição das células buliformes e o enrolamento das folhas em *Saccharum* spp.

6.5. Referências Bibliográficas

- ABBAS, S.R.; AHMAD, S.D.; SABIR, S.M.; SHAH, A.H. Detection of drought tolerant sugarcane genotypes (*Saccharum officinarum*) using lipid peroxidation, antioxidante activity, glycine-betaine and proline contentes. **Journal of Soil Science and Plant Nutrition**, v.14, n.1, p.233-243, 2014.
- AKHTAR, S.; WAHID, A.; RASUL, E. Emergence, growth and nutrient composition of sugarcane sprouts under NaCl salinity. **Biologia Plantarum**, v.46, n.1, p.113-116, 2003.
- ANDRADE, S.R. **Princípios da cultura de tecidos vegetais**. Planaltina, Documentos/EMBRAPA CERRADOS, 2002. 58p.
- ANITHA, R.; MARY, P.C.N.; SAVERY, M.A.J.R.; SRITHARAN, N.; PURUSHOTHAMAN, R.S. Differential responses of sugarcane (*Saccharum officinarum* L.) genotypes under salt stress condition. **Plant Archives**, v.15, n.2, p.1055-1060, 2015.
- ARNON, D. I. Copper enzymes in isolated chloroplasts: polyphenoloxylase in *Beta vulgaris*. **Plant Physiology**, v.4, n.1, p.1-15, 1949.
- ASHRAF, M.; HARRIS, P. J. C. Potential biochemical indicators of salinity tolerance in plants. **Plant Science**, v.166, n.1, p.3-6, 2004.
- AVINASH, L.; PRASHANT, N.; BHAROSE, A. A. *In vitro* screening of sugarcane cultivar Co 86032 for salinity tolerance. **Journal of Sugarcane Research**, v.2, n.1, p.25-31, 2012.
- BATES L. S.; WALDREN R. P.; TEARE I. D. Rapid determination of free proline for water-stress studies. **Plant Soil**, v.39, n.1, p.205–207, 1973.
- CASU, R.E.; DIMMOCK, C.M.; CHAPMAN, S.C.; GROF C.P.L., et al. Identification of differentially expressed transcripts from maturing stem of sugarcane by in silico analysis of stem expressed sequence tags and gene expression profiling. **Plant Molecular Biology**, v.54, n.4, p.503-517, 2004.
- CHA-UM, S.; KIRDMANEE, C. Proline accumulation, photosynthetic abilities and growth characters of sugarcane (*Saccharum officinarum* L.) plantlets in response to iso-osmotic salt and water-deficit stress. **Agricultural Science in China**, v.8, n.1, p.51-58, 2009.
- CHA-UM, S.; SUPAIBULWATANA, K.; KIRDMANEE, C. Glycinebetaine accumulation, physiological characterizations, and growth efficiency in salt tolerant and salt sensitive lines of indica rice (*Oryza sativa* L. spp. *indica*) response to salt stress. **Journal of Agronomy and Crop Science**, v.193, n.3, p.157-166, 2007.
- CHRISTY, P.M.; PREETHA, R.D.; VASANTHA, S.; DIVYA, D. Biochemical and molecular analysis of sugarcane genotypes response to salinity and drought. **International journal of applied biology and pharmaceutical technology**, v.4, n.1, p.210-218, 2013.
- ERRABII, T.; GANDONOU, C.B.; ESSALMANI, H.; ABRINI, J.; et al. Effects os NaCl and mannitol induced stress on sugarcane (*Saccharum* sp.) callus cultures. **Acta Physiologiae Plantarum**, v.29, p.95-102, 2007.
- FILIPPOU, P.; BOUCHAGIER, P.; SKOTTI, E.; FOTOPOULOS, V. Proline and reactive oxygen/nitrogen species metabolism is involved in the tolerant response of the invasive plant species *Ailanthus altissima* to drought and salinity. **Environmental and Experimental Botany**, v.97, p.1-10, 2014.

GANDONOU, C.B.; ERRABI, T.; ABRINI, J.; IDAOMAR, M.; SENHAJI, N.S. Selection of callus cultures of sugarcane (*Saccharum* sp.) tolerant to NaCl and their response to salt stress. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, v.87, n.1, p.9-16, 2006.

GANDONOU, C.H. ; ABRINI, J. ; IDAOMAR, M. ; SKALI-SENHAJI, N. Effects of NaCl on growth and ion and proline accumulation in sugarcane (*Saccharum* sp.) callus culture. **Belgian Journal of Botany**, v.138, n.2, p.173-180, 2005.

GOMÉZ, D.; HERNÁNDEZ, L.; VALLE, B; MARTÍNEZ, J.; CID, M.; ESCALONA, M.; HERNÁNDEZ, M.; YABOR, L.; BEEMSTER, G.T.S.; TEBBE, C.C.; PAPENBROCK, J.; LORENZO, J.C. Salinity induces specific metabolic changes in sugarcane shoot explants in temporary immersion bioreactors. **Journal of Applied Botany and Food Quality**, v.90, p. 354-358, 2017.

GORDIN, C.R.B.; MARQUES, R.F.; MASSETO, T.E.; SOUZA, L.C.F. de. Estresse salino na germinação de sementes e desenvolvimento de plântulas de niger (*Guizotia abyssinica* (L.f.) Cass.). **Acta Botanica Brasilica**, v.26, n.4, p.966-972, 2012.

GRANJA, M.M.C.; MEDEIROS, M.J.L.; SILVA, M.M.A.; CAMARA, T.R.; WILLADINO, L.; ULISSES, C. Response to *in vitro* salt stress in sugarcane is conditioned by concentration and condition of exposure to NaCl. **Acta Biologica Colombiana**, v.23, n.1, p.30-38, 2018.

HU, Y.; BURUCS, Z.; VON TUCHER, S.; SCHMIDHALTER, U. Short term effects of drought and salinity on mineral nutrient distribution along growing leaves of maize seedlings. **Environmental and Experimental Botany**, v.60, n.2, p.268-275, 2007.

MARIJUAN, M. P.; BOSCH, S. M. Ecophysiology of invasive plants: osmotic adjustment and antioxidants. **Trends in Plant Science**, v.18, n.12, p.660-666, 2013.

MUDGAL, V.; MADAAN, N.; MUDGAL, A. Biochemical mechanisms of salt tolerance in plants: A review. **International Journal of Botany**, v.6, p.136-143, 2010.

MUNNS, R.; HUSAIN, S. RIVELLI, A.R.; RICHARD, A.J.; CONDON, A.G.; MEGAN, P.L.; EVANS, S.L.; SCHACHTMAN, D.P.; HARE, R.A. Avenues for increasing salt tolerance of crops, and the role of physiologically based selection traits. **Plant and Soil**, v.247, n.1, p.93-105, 2002.

MUNNS, R.; JAMES, R.A.; LAUCHLI, A. Approaches to increasing the salt tolerance of wheat and other cereals. **Journal of Experimental Botany**, v.57, n.5, p.1025-1043, 2006.

MUNNS, R.; TESTER, M. Mechanisms of salinity tolerance. **Annual Review of Plant Biology**, v.59, p.651-81, 2008.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, v.15, p.473-497, 1962.

NAWAZ, N.; HUSSAIN, K.; MAJEED, A.; KHAN, F.; AFGHAN, S.; ALI, K. Fatality of salt stress to plants: Morphological, physiological and biochemical aspects. **African Journal Biotechnology**, v.9, n.34, p.5475-5480, 2010.

OLIVEIRA, L.A.R.; CARDOSO, M.N.; OLIVEIRA, A.C.A.; MACHADO, C.A.; CARDOSO, B.T.; SILVA, A.V.C.; LEDO, A.S. Effects of *in vitro* drought stress on growth, proline accumulation and antioxidant defense in sugarcane. **Journal of Agricultural Science**, v.10, n.5, p.135-149, 2018a.

OLIVEIRA, L.A.R.; OLIVEIRA, A.C.A.; MACHADO, C.A.; CARDOSO, M.N.; SANTANA, F.V.; MIRANDA, I.C.D.; CASTRO, E.M.; SILVA, A.V.C.; LEDO, A.S. Induction, growth kinetics and morpho-histological characterization of neem callus. **Journal of Agricultural Science**, v.10, n.6, p.283-290, 2018b.

PAGARIYA, M. C.; DEVARUMATH, R.; KAWAR, P. G. Biochemical characterization and identification of differentially expressed candidate genes in salt stressed sugarcane. **Plant Science**, v.184, p.1-13, 2012.

PARIDA, A. K.; DAS, A. B. Salt tolerance and salinity effects on plants: a review. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v.60, n.3, p.324-349, 2005.

PATADE, V. Y.; BHARGAVA, S.; SUPRASANNA, P. Salt and drought tolerance of sugarcane under iso-osmotic salt and water stress: growth, osmolytes accumulation, and antioxidante defense. **Journal of Plant Interactions**, v.6, n.4, p.275-282, 2011.

PATADE, V. Y.; BHARGAVA, S.; SUPRASANNA, P. Effects of NaCl and iso-osmotic PEG stress on growth, osmolytes accumulation and antioxidante defense in cultured sugarcane cells. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, v.108, n.2, p.279-286, 2012.

PATADE, V. Y.; SUPRASANNA, P.; BAPAT, V. A. Effects of salt stress in relation to osmotic adjustment on sugarcane (*Sacharum officinarum* L.) callus cultures. **Plant Growth Regulation**, v.55, p.169-173, 2008.

PLAUT, Z., MEINZER, F. C.; FEDERMAN, E. Leaf development, transpiration and ion uptake and distribution in sugarcane cultivars grown under salinity. **Plant Soil**, v.218, n.1-2, p.59-69, 2000.

POONSAWAT, W.; THEERAWITAYA, C.; SUWAN, T.; MONGKOLSIRIWATANA, C.; et al. Regulation of some salt defense-related genes in relation to physiological and biochemical changes in three sugarcane genotypes subjected to salt stress. **Protoplasma**, v.252, n.1, p.231-243, 2015.

REDDY, I.N.B.L.; KIM, B.K.; YOON, I.S.; KIM, K.H.; KWON, T.R. Salt Tolerance in Rice: Focus on Mechanisms and Approaches. **Rice Science**, v.24, n.3, p.123-144, 2017.

RHOADES, J. D.; KANDIAH, A.; MASHALI, A. M. Uso de águas salinas para a produção agrícola. In: Gheyi HR, Sousa JR & Queiroz JE (Eds.) **Estudos FAO de irrigação e drenagem**. Campina Grande, UFPB, 2000. p.40-48.

SANTOS, P.R.; RUIZ, H.A.; NEVES, J.C.L. ALMEIDA, E.F.; FREIRE, M.B.G.; FREIRE, F.J. Germinação, vigor e crescimento de cultivares de feijoeiro em soluções salinas. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v.13, p.882-889, 2009.

SAS Institute Inc. **Statistical Analysis System**, SAS 9.4 Help and Documentation, Cary, NC: SAS Institute Inc., 2013. http://www.sas.com/en_us/software/sas9.html

SATBHAI, R. D.; NAIK, R. M. Osmolytes accumulation, cell membrane integrity, and antioxidant enzymes in sugarcane varieties differing in salinity tolerance. **Sugar Tech**, v.16, n.1, p.30-35, 2014.

SIMÕES, W.L.; CALGARO, M.; COELHO, D.S.; SANTOS, D.B.; SOUZA, M. A. Growth of sugar cane varieties under salinity. **Revista Ceres**, v.63, n.2, p.265-271, 2016.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. 4. ed. Porto Alegre: Artmed, 2009. 848p.

TEIXEIRA, J.; PEREIRA, S. High salinity and drought act on an organ-dependent manner on potato glutamine synthetase expression and accumulation. **Environmental and Experimental Botany**, v.60, n.1, p.121-126, 2007.

WAHID, A.; GHAZANFAR, A. Possible involvement of some secondary metabolites in salt tolerance of sugar cane. **Journal of Plant Physiology**, v.163, n.7, p.723-730, 2006.

WANG, Z.; XIONG, L.; LI, W.; ZHU, J.; ZHU, J. The plant cuticle is required for osmotic stress regulation of abscisic acid biosynthesis and osmotic stress tolerance in Arabidopsis. **The Plant Cell May**, v.23, n.5, p.1971-1984, 2011.

WILLADINO, L. et al. Mechanisms of tolerance to salinity in banana: physiological, biochemical, and molecular aspects. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v.39, n.2, p.1-8, 2017.

YOUNIS, M. E.; HASANEEN, M. N. A.; KAZAMEL, A. M. S. Exogenously applied ascorbic acid ameliorates detrimental effects of NaCl and mannitol stress in *Vicia faba* seedlings. **Protoplasma**, v.239, n.1, p.39-48, 2010.

VASANTHA, S.; GOMATHI, R. Growth and development of sugarcane under salinity. **Journal Sugarcane Research**, v.2, p.1-10, 2012.

VERBRUGGEN, N.; HERMANS, C. Proline accumulation in plants: a review. **Amino Acids**, v.35, n.4, p.753-759, 2008.

7. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os estresses abióticos são fatores ambientais que causam os maiores danos nos processos fisiológicos e metabólicos das plantas acarretando em prejuízos para a agricultura, e esse é um dos motivos que tem despertado grande interesse da pesquisa, que tem buscado incessantemente por cultivares mais produtivas sob condições desfavoráveis de cultivo.

O estudo sobre o comportamento das plantas frente aos estresses hídrico e salino *in vitro* através da análise de caracteres biométricos, fisiológicos, bioquímicos e anatômicos, permitiu a caracterização dos acessos, em diferentes graus de tolerância, tanto entre espécies diferentes quanto da mesma espécie, possibilitando a identificação dos mais tolerantes antes de sua verificação em campo.

O presente estudo apresenta ainda mérito para o desenvolvimento científico e tecnológico, considerando que se trata da caracterização de novos acessos do complexo *Saccharum* que ainda não foram caracterizados quanto aos principais estresses presentes na região Nordeste.

ANEXOS

ANEXO 1- Artigo publicado em Genetics and Molecular Resarch: **Genetic diversity of *Saccharum* complex using ISSR markers**

Pg. 71

ANEXO 2- Artigo publicado em Journal of Agricultural Sience: **Effects of *in vitro* Drought Stress on Growth, Proline Accumulation and Antioxidant Defense in Sugarcane**

Pg. 72

ANEXO 3- Artigo publicado em Bioscience Journal: **BIOCHEMICAL, PHYSIOLOGICAL AND GROWTH CHANGES IN RESPONSE TO *IN VITRO* SALINITY IN SUGARCANE**

Pg. 73



Genetic diversity of *Saccharum* complex using ISSR markers

L.A.R. Oliveira¹, C.A. Machado¹, M.N. Cardoso¹, A.C.A. Oliveira¹,
A.L. Amaral², A.R.C. Rabbani³, A.V.C. Silva² and A.S. Ledo²

¹Programa de Pós-Graduação em Agricultura e Biodiversidade,
Universidade Federal de Sergipe, Aracaju, Sergipe, Brasil

²Embrapa Tabuleiros Costeiros, Aracaju, Sergipe, Brasil

³Instituto Federal da Bahia, Porto Seguro, Bahia, Brasil

Corresponding author: L.A.R. Oliveira

E-mail: leila.a.resende@gmail.com

Genet. Mol. Res. 16 (3): gmr16039788

Received July 28, 2017

Accepted August 18, 2017

Published September 21, 2017

DOI <http://dx.doi.org/10.4238/gmr16039788>

Copyright © 2017 The Authors. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution ShareAlike (CC BY-SA) 4.0 License.

ABSTRACT. Sugarcane (*Saccharum* sp, Poaceae) is native to Southeast Asia, and due to growing demand as raw material, its cultivation recently expanded to new frontiers. The genetic diversity analysis is essential for targeting strategies in the formation and maintenance of a germplasm. This study aimed to assess the genetic diversity of 26 accessions of sugarcane from the Active Germplasm Bank of Embrapa Coastal Tablelands, using inter-simple sequence repeat (ISSR) molecular markers. Sixteen primers were used, resulting in 87 fragments with 91.13% of polymorphism. The similarity of the individuals ranged between 0.22 and 0.87. Individuals RB867515 and RB92579 were closer genetically, and the most distant ones were PI240785 and NSL 291970. Four distinct clusters were formed, using UPGMA. This information can be used to prioritize the selection of accessions for the conduction of hybridization in breeding and germplasm exchange actions.

Key words: *S. officinarum*; *S. robustum*; *S. sinensis*; *S. spontaneum*; ISSR molecular mark

Effects of *in vitro* Drought Stress on Growth, Proline Accumulation and Antioxidant Defense in Sugarcane

Leila Albuquerque Resende de Oliveira¹, Milena Nascimento Cardoso¹, Annie Carolina Araújo de Oliveira¹, Caroline de Araújo Machado¹, Bruno Trindade Cardoso², Ana Veruska Cruz da Silva² & Ana da Silva Ledo²

¹ Programa de Pós-graduação em Agricultura e Biodiversidade, Universidade Federal de Sergipe, Sergipe, Brazil

² Embrapa Tabuleiros Costeiros, Aracaju, Sergipe, Brazil

Correspondence: Leila Albuquerque Resende de Oliveira, Programa de Pós-graduação em Agricultura e Biodiversidade, Universidade Federal de Sergipe, Av. Marechal Rondon s/n, São Cristóvão, Sergipe, Brazil. E-mail: leila.a.resende@gmail.com

Received: January 23, 2018 Accepted: February 24, 2018 Online Published: April 15, 2018

doi:10.5539/jas.v10n5pxx

URL: <https://doi.org/10.5539/jas.v10n5pxx>

Abstract

Drought is the most limiting environmental factor to crop productivity and presents a great variability in the degree of tolerance among and within species, among varieties. The aim of this study was to characterize sugarcane accessions regarding tolerance to water stress during *in vitro* cultivation based on changes in biometric, physiological and biochemical characteristics, within species and among species, to support future breeding programs. Adventitious shoots of five sugarcane accessions: *Saccharum robustum*, *Saccharum spontaneum* and *Saccharum officinarum* species, cultivated in Murashige and Skoog medium supplemented with 2% sucrose and 4 g/l Phytigel were used in five water potentials, 0, -0.3, -0.6, -0.9, -1.2 MPa, induced by mannitol. Survival, length of shoots and roots, number of shoots and roots, biomass, proline content in leaves and activity of antioxidant enzymes were analyzed. There is difference among species, and also, within the same sugarcane species when submitted to *in vitro* drought stress, and *S. officinarum* was shown to be the most tolerant. Proline can be used as a biochemical indicator of response to drought in sugarcane accessions and its accumulation was intensified in *S. robustum* and *S. spontaneum* accessions. Catalase activity remained unchanged with increased drought in sugarcane accessions evaluated.

Keywords: antioxidant enzymes, osmotic adjustment, *Saccharum officinarum*, *Saccharum robustum*, *Saccharum spontaneum*

1. Introduction

Drought stress is one of the environmental factors that causes great damage to the physiological and metabolic processes of plants (Taiz & Zeiger, 2009), and one of the most studied due to its strong impact on crop productivity (Filippou et al., 2014). There is great variability in the degree of drought tolerance among species, and even among varieties of a species. This difference is observed through the value of the ideal water potential for plants and the development stage in which the stress occurs (Inmam-Bamber & Smith, 2005; Pimentel, 2004). In sugarcane, among four distinct growth stages, tillering and rapid growth have been identified as critical for water demand (Ramesh, 2000), causing severe production losses. In these stages, 70-80% of all biomass accumulated during the crop cycle are produced (Oliveira et al., 2010).

Drought tolerance is a mechanism that allows plant to maintain its metabolism, even with reduction of the water potential of tissues (Taiz & Zeiger, 2009), mainly due to the accumulation of compatible solutes and the antioxidant capacity (Verslues et al., 2006). The osmotic adjustment is considered an active mechanism of accumulation of solutes in cells with reduction of the cell water potential without decreasing in turgidity or in cell volume and, consequently, the maintenance of the turgor pressure, which provides the maintenance of the plant vital processes (Basu et al., 2016). When accumulated during water deficit, solutes act to maintain the water balance in the cell, in the protection of enzymes and membranes, and are sources of nitrogen and carbon after rehydration (Ashcroft & Foolad, 2007; Mccree et al., 1984; Yordanov et al., 2003). In addition, plants also activate enzymatic protection mechanisms. These mechanisms include antioxidant enzymes such as superoxide

BIOCHEMICAL, PHYSIOLOGICAL AND GROWTH CHANGES IN RESPONSE TO *IN VITRO* SALINITY IN SUGARCANE

ALTERAÇÕES BIOQUÍMICAS, FISIOLÓGICAS E DE CRESCIMENTO EM RESPOSTA À SALINIDADE *IN VITRO* EM CANA-DE-AÇÚCAR

Leila Albuquerque Resende de OLIVEIRA¹; Milena Nascimento CARDOSO¹;
Annie Carolina Araújo de OLIVEIRA¹; Caroline de Araújo MACHADO²;
Fernanda Vieira SANTANA³; Bruno Trindade CARDOSO⁴; Evaristo Mauro de
CASTRO⁵; Ana Veruska Cruz da SILVA⁶; Ana da Silva LEDO⁶

1. PhD student in Agricultura e Biodiversidade, Universidade Federal de Sergipe, São Cristóvão, SE, Brazil. leila.a.resende@gmail.com; 2. PhD in Agricultura e Biodiversidade, Universidade Federal de Sergipe, São Cristóvão, SE, Brazil; 3. Master in Agricultura e Biodiversidade, Universidade Federal de Sergipe, São Cristóvão, SE, Brazil; 4. Analyst at the Embrapa Tabuleiros Costeiros, Aracaju, SE, Brazil; 5. Professor in the Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG, Brazil; 6. Research at the Embrapa Tabuleiros Costeiros, Aracaju, SE, Brazil.

ABSTRACT: Abiotic stresses in plants have aroused great research interest, unceasingly seeking for more productive cultivars under unfavorable cultivation conditions. Water deficiency and soil salinity are the most studied aspects, due to their strong impact on the growth and productivity of plants. The objective of this study was to evaluate accessions of different sugarcane species (*Saccharum* spp., *S. robustum*, *S. officinarum*) regarding tolerance to *in vitro* salinity, from changes in physiological, anatomical, biochemical and biometric parameters, to assist in breeding programs. To this end, shoots were used, grown on Murashige and Skoog medium, supplemented with 2% of sucrose and 4 g.L⁻¹ Phytigel, in the presence of five concentrations 0, 50, 100, 150, 200 mM NaCl. Shoots length, roots length, shoots number, roots number, fresh weight, dry weight, proline content in leaves, total chlorophyll content, and morphological changes to the leaf tissue were analyzed. The *in vitro* growth of accessions *Saccharum robustum*, *Saccharum* spp. and *Saccharum officinarum* are affected by salinity induced by NaCl. The proline accumulation and chlorophyll decrease are intensified in *Saccharum* spp., in addition to changes in cell's anatomy, characterized as more sensitive to salt.

KEYWORDS: Chlorophyll. Histology. Proline. *Saccharum officinarum*. *Saccharum robustum*. *Saccharum* spp.

INTRODUCTION

Sugarcane (*Saccharum* sp.) is a plant of the Poaceae family, of C₄ photosynthetic metabolism, native to Southeast Asia (CASU et al., 2004), that is quite sensitive to salinity (AKHTAR et al, 2003; PLAUT et al., 2000). Wahid and Ghazanfar (2006) state that salt tolerance varies among sugarcane varieties.

The plants response to salinity conditions is related to degree of salt tolerance, which depends on concentration and nature of dissolved salts, climatic factors, water absorption, and plant nutrition (VASANTHA; GOMATHI, 2012). The different responses obtained from varieties of sugarcane regarding tolerance to salinity are related to the mechanisms developed by them to minimize the osmotic effect of salts in the soil, which limits the water absorption besides the less vulnerability to toxic concentrations of ions such as Na⁺ and Cl⁻ (MUNNS; TESTER, 2008).

Generally, the first effect of salinity on plants development is growth reduction, caused by water potential decrease in soil solution to a level below the necessary for the water absorption by root cells, thus preventing cell expansion, since the potential of cell pressure tends to equate with that of the soil (TAIZ; ZEIGER, 2009).

Several protection mechanisms are activated in plants due to adverse growth conditions, among them osmotic adjustment through the compatible solutes accumulation, becoming one of the most effective physiological mechanisms to protect and maintain the cell's turgescence (MARIJUAN; BOSCH, 2013).

Some other physiological and biochemical strategies to tolerate salt stress damage include selective ion accumulation or exclusion, changes in photosynthetic pathways, photosynthetic pigment degradation.

